

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0613548-0 A2**

(22) Data de Depósito: 25/04/2006
(43) Data da Publicação: 18/01/2011
(RPI 2089)



* B R P I 0 6 1 3 5 4 8 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/62
C07K 7/06
A61K 8/64

(54) Título: **COMPOSIÇÕES DE CUIDADO PESSOAL E MÉTODOS PARA SEU USO**

(30) Prioridade Unionista: 05/05/2005 US 60/678,601

(73) Titular(es): GENENCOR INTERNATIONAL, INC.

(72) Inventor(es): ANITA VAN KIMMENADE, ANTHONY DAY, BRIAN SCHMIDT, CHRISTOPHER J. MURRAY, DAVID A. ESTELL, GRANT C. GANSHAW, GUDRUN VOGTENTANZ, HANS DE NOBEL, JEFFREY V. MILLER, KATHERINE D. COLLIER, MARC KOLKMAN, RAJ LAD, SCOTT D. POWER

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006015711 de 25/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/121610 de 16/11/2006

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES DE CUIDADO PESSOAL E MÉTODOS PARA SEU USO. A presente invenção refere-se a peptídeos e peptídeos suportados para tratar várias doenças e condições. Em modalidades particularmente preferidas, a presente invenção provê composições e métodos para cuidado pessoal. Em algumas modalidades, a presente invenção provê composições para uso em cuidado da pele e/ou do cabelo, assim como composições cosméticas. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, a presente invenção provê peptídeos e peptídeos suportados para tratar doenças da pele, como rosácea. Em algumas modalidades particularmente preferidas, os peptídeos suportados da presente invenção são peptídeos anti-VEGF. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, os peptídeos anti-VEGF são expressados em uma proteína de suporte de esqueleto. Em algumas modalidades mais preferidas, a proteína de esqueleto compreende BBI.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÕES DE CUIDADO PESSOAL E MÉTODOS PARA SEU USO**".

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a peptídeos e peptídeos suportados para tratar várias doenças e condições. Em modalidades particularmente preferidas, a presente invenção provê métodos e composições de cuidado pessoal. Em algumas modalidades, a presente invenção provê composições para uso em cuidado da pele e/ou do cabelo, assim como composições cosméticas. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, a presente invenção provê peptídeos e peptídeos suportados para tratar doenças da pele, como rosácea. Em algumas modalidades particularmente preferidas, os peptídeos suportados da presente invenção são peptídeos anti-VEGF. Em modalidades alternativas particularmente preferidas, os peptídeos anti-VEGF são expressos em uma proteína do esqueleto ("scaffold proteins"). Em algumas modalidades mais preferidas, a proteína esquelotocompreende BBI.

Antecedentes da Invenção

Angiogênese é o desenvolvimento de um suprimento de sangue a uma dada área de tecido. A angiogênese faz parte do desenvolvimento embrionário normal e revascularização de leitos de feridas, assim como devido aos estímulos do crescimento de vasos por células inflamatórias ou malignas. A angiogênese é também o processo através do qual os tumores ou condições inflamatórias derivam um suprimento de sangue através da geração de microvasos.

A angiogênese é regulada em tecidos de câncer normais e malignos pelo balanço dos estímulos angiogênicos e inibidores angiogênicos inibidores que são produzidos no tecido alvo e em sítios distantes (vide, Fidler *et al.*, [1998]; e McNamara *et al.*, [1998]). Fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF, também conhecido como fator de permeabilidade vascular, "VPF") é um estimulante primário de angiogênese. VEGF é uma citocina multifuncional que é induzida por hipoxia e mutações oncogênicas e pode ser produzida por uma ampla variedade de tecidos (vide, Kerbel *et al.*, [1998]; e Mazure *et al.*, [1996]).

O reconhecimento de VEGF como um estímulo primário de angiogênese em condições patológicas tem levado a várias tentativas de bloquear a atividade de VEGF. Anticorpos de receptor anti-VEGF inibidores, constructos de receptor solúveis, estratégias anti-sentido, aptâmeros de RNA
5 contra VEGF e inibidores de VEGF receptor tirosina quinase de peso molecular baixo (RTK) foram, todos, propostos para uso na interferência com a sinalização de VEGF (vide, Siemeister *et al.*, [1998]). De fato, anticorpos monoclonais contra VEGF foram mostrados como inibindo o crescimento de xenoenxertos de tumor e a formação de ascitos em camundongos (vide, Kim
10 *et al.*, [1993]; Asano *et al.*, [1998]; Mesiano *et al.*, [1998]; Luo *et al.*, [1998a] e [1998b]; e Borgstrom *et al.*, [1996] e [1998]).

RTKs compreendem uma grande família de receptores de transmembrana para fatores de crescimento de polipeptídeo com atividades biológicas diversas. A função intrínseca de RTKs é ativada quando da ligação
15 do ligando que resulta em fosforilação do receptor e substratos celulares múltiplos e subseqüentemente em várias respostas celulares. (vide, Ullrich & Schlessinger, Cell 61:203-212 [1990]).

Angiogênese, envolvendo VEGF e RTKs não está somente envolvida no desenvolvimento de câncer, como muitas outras doenças ou condições afetando diferentes sistemas fisiológicos são dependentes de angiogênese, como artrite e placas ateroscleróticas (ossos e ligamentos) retinopatia diabética, glaucoma neovascular, degeneração macular, ocular, tracoma e neovascularização de enxerto da córnea (olho), psoríase, escleroderma, rosácea, hemangioma e cicatrizes hipertróficas (pele), adesões vasculares e
25 angiofibroma (sistema sangüíneo).

VEGF é um fator de angiogênese de principal importância para a vascularização da pele (Detmar [2000]). A expressão de VEGF é regulada de modo positivo na epiderme hiperplásica de psoríase (Detmar e Yeo *et al.* [1995]), na cicatrização de feridas e em outras doenças caracterizadas por
30 angiogênese melhorada (Detmar [2000], *supra*). A super-expressão marcada de VEGF na epiderme de camundongos transgênicos foi relatada como resultando em melhorada vascularização da pele com números iguais de vasos

sangüíneos tortuosos e vazados (Ver por exemplo, Brown *et al.* [1998]). Também, a síntese crônica de VEGF na pele de camundongos leva ao primeiro modelo de murinos histologicamente equivalente de psoríase humana (Xia *et al.* [2003]) que é reversível por agentes de ligação específicos para VEGF.

Proteases estão envolvidas em vários processos biológicos. A ruptura do equilíbrio entre proteases e inibidores de protease é com frequência associada com destruição de tecido patológico. De fato, vários estudos focalizaram o papel de proteases em dano ao tecido, e pensa-se que o equilíbrio entre proteases e inibidores de protease é um determinante principal na manutenção da integridade do tecido. As serina proteases de células inflamatórias, incluindo neutrófilos, estão implicadas em vários distúrbios inflamatórios, como enfisema pulmonar, artrite, dermatite atópica e psoríase.

As proteases também parecem funcionar na difusão de alguns cânceres. As células normais existem em contato com uma rede de proteína complexa, chamada a matriz extracelular (ECM). A ECM é uma barreira ao movimento de células e células de câncer devem projetar modos para romper suas fixações, degradar, e se movimentar através da ECM a fim de formar metástases. As proteases são enzimas que degradam outras proteínas e auxiliam, como se pensa há muito tempo, na liberação das células de tumor de seu local original por mastigação da ECM. Estudos recentes sugeriram que elas podem promover mudanças de forma e motilidade através da ativação de uma proteína na membrana da célula de tumor chamada receptor ativado por protease 2 (PAR2). Isto leva a uma cascata de reações intracelulares que ativam o aparelho de motilidade da célula. Assim, formula-se a hipótese de que uma das primeiras etapas na metástase de tumor é uma reorganização da forma celular, como que forma uma protrusão distinta em uma borda voltada para a direção de migração. A célula então migra através da parede do vaso sangüíneo e se movimenta para locais distais, eventualmente refixando-se e formando um tumor metastático. Por exemplo, as células epiteliais prostáticas humanas secretam, constitutivamente, antígeno específico de próstata (PSA), uma serina protease similar a calicreína, que é

um componente normal do plasma seminal. A protease atua para degradar a matriz extracelular e facilitar a invasão de células cancerosas.

Os inibidores de protease sintéticos e naturais foram mostrados para inibir a promoção de tumor em *vivo* e em *vitro*. As investigações anteriores têm indicado que alguns inibidores de protease pertencendo a uma família de proteínas estruturalmente relacionadas classificadas como inibidores de serina protease ou SERPINS, são conhecidos para inibir várias proteases incluindo tripsina, catepsina G, trombina, e calicreína de tecido, assim como elastase de neutrófilos. Os SERPINS são extremamente eficazes na prevenção / supressão de transformação induzida por carcinógenos em *vitro* e carcinogênese em sistemas de modelos de animais. A liberação sistêmica de inibidores de protease purificados aparentemente reduz a inflamação das juntas e também a destruição de ossos e cartilagem.

A administração tópica de inibidores de protease encontra uso em tais condições como dermatite atópica, uma forma comum de inflamação da pele, que pode estar localizada em algumas porções ou envolver porções grandes do corpo. A atividade de despigmentação de inibidores de protease e sua capacidade de evitar a pigmentação induzida por ultra-violeta foram demonstradas tanto em *vitro* como em *vivo*. (Ver por exemplo, Paine *et al.*, J. Invest. Dermatol., 116:587-595 [2001]). Os inibidores de protease também foram relatados para facilitar a cicatrização de feridas. Por exemplo, inibidor de protease de leucócitos secretórios foram demonstrados como revertendo a destruição de tecido e acelerando o processo de cicatrização de feridas quando topicamente aplicado. Além disso, inibidores de serina também podem ajudar a reduzir a dor em pacientes com lúpus eritematoso (Ver por exemplo, Patente US Nº 6537968).

O inibidor de protease Bowman-Birk (BBI) é uma designação de uma família de inibidores de enzima tripsina e quimotripsina de peso molecular baixo, estáveis, encontrados em soja e em outras sementes, principalmente sementes leguminosas e materiais vegetais. BBI compreende uma família de proteína ligadas a dissulfeto com um peso molecular de cerca de 8 kD (Ver por exemplo, Chou *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71:1748-1752

[1974]; Yavelow *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5395-5399 [1985]; e Yavelow *et al.*, Cancer Res. (Suppl.) 43:2454s-2459s [1983]). BBI tem uma estrutura pseudo-simétrica de dois domínios tricíclicos contendo, cada, um laço nativo de ligação independente, o laços nativos contendo sítios de ligação tanto para tripsina como quimotripsina (vide, Liener, em Summerfield e Bunting (eds), Advances em Legume Science, Royal Bot. Gardens, Kew, England). Estes sítios de ligação tem, cada, uma estrutura de laço canônico, que é um motivo encontrado em vários inibidores de serina proteinase (Bode e Huber, Eur. J. Biochem., 204:433-451 [1992]). Comumente, como em um dos inibidores de soja, um dos laços nativos inibe tripsina e os outros inibem quimotripsina (vide, Chen *et al.*, J. Biol. Chem., 267:1990-1994 [1992]; Werner & Wemmer, Biochem., 31:999-1010 [1992]; Lin *et al.*, Eur. J. Biochem., 212:549-555 [1993]; e Voss *et al.*, Eur. J. Biochem., 242:122-131 [1996]) apesar de em outros organismos (por exemplo, *Arabidopsis*), ambos os laços são específicos para tripsina.

STI inibe a atividade proteolítica de tripsina pela formação de um complexo estequiométrico estável (Ver por exemplo, Liu, Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components, *In: Soybeans, Chemistry, Technology and Utilization*, pp. 32-35, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Md., [1999]). STI consiste em 181 resíduos de aminoácidos com duas pontes dissulfeto e é de forma grosseiramente esférica (Ver por exemplo, Song *et al.*, J. Mol. Biol., 275:347-63 [1998]). O laço inibidor de tripsina está dentro da primeira ponte dissulfeto. O inibidor de tripsina de soja de tipo Kunitz (STI) tem desempenhado um papel chave no estudo anterior de proteinases, tendo sido usado como o substrato principal no trabalho bioquímico e cinético que levou à definição do mecanismo padrão de ação de inibidores de proteinase.

Eglin C é uma proteína monomérica pequena que pertence à família de inibidor de quimotripsina de batata dos inibidores de serina protease. As proteínas que pertencem a esta família são geralmente pequenas (60-90 resíduos de aminoácidos em comprimento) e não contém ligações dissulfeto. Eglin C, no entanto, é altamente resistente à desnaturação por

acidificação ou calor apesar da falta de ligações dissulfeto para ajudar a estabilizar sua estrutura terciária. A proteína ocorre naturalmente no parasita *Hirudo medicinalis*.

Como notado acima, inibidores de protease interferem com a ação de proteases. Os inibidores de protease naturalmente ocorrendo podem ser encontrados em vários alimentos como grãos de cereais (aveia, cevada e milho), couve-de-bruxelas, cebolas, beterraba, trigo, painço miúdo e amendoim. Uma fonte de interesse é a soja. O nível médio de inibidores de protease presentes em soja é em torno de 1,4 por cento e 0,6 por cento para Kunitz e Bowman-Birk respectivamente, dois dos mais importantes inibidores de protease. Notavelmente, estes baixos níveis tornam impraticável isolar o inibidor de protease natural para aplicações clínicas e outras. De fato, apesar de muita pesquisa na arena de cuidado pessoal, permanece a necessidade na técnica para composições de cuidado pessoal que tem características desejadas sem modificação química indesejável das proteínas. Também permanece a necessidade na técnica para um método de liberação de uma proteína em uma composição de cuidado pessoal de modo a eficazmente liberar a proteína em uma forma utilizável.

Sumário da Invenção

A presente invenção provê peptídeos e peptídeos suportados para tratar várias doenças e condições. Em modalidades particularmente preferidas, a presente invenção provê composições e métodos de cuidado pessoal. Em algumas modalidades, a presente invenção provê composições para uso em cuidado da pele e/ou do cabelo, assim como composições cosméticas. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, a presente invenção provê peptídeos e peptídeos suportados para tratar doenças da pele, como rosácea. Em algumas modalidades particularmente preferidas, os peptídeos suportados da presente invenção são peptídeos anti-VEGF. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, os peptídeos anti-VEGF são expressados em uma proteína do esqueleto. Em algumas modalidades mais preferidas, a proteína do esqueleto compreende BBI.

Em algumas modalidades preferidas, a presente invenção provê

compostos cosméticos e/ou farmacêuticos apropriados para melhorar a aparência da pele. A presente invenção ainda provê peptídeos que bloqueiam a ligação de uma proteína. Em algumas modalidades preferidas, a proteína é VEGF. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o peptídeo é expressado em um esqueleto resistente a protease. em algumas modalidades especialmente preferidas, o esqueleto é um inibidor de protease (por exemplo, BBI, STI, ou inibidor de quimotripsina Elgin). Em algumas modalidades mais preferidas, o inibidor de protease é BBI.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê composições de cuidado pessoal compreendendo um suporte de esqueleto, em que o esqueleto compreende pelo menos um inibidor de protease e pelo menos um peptídeo selecionado dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17. Em modalidades alternativas, qualquer uma das seqüências de peptídeos adicionais providas aqui encontram uso na presente invenção. Em outras modalidades, seqüências adicionais encontram uso na presente invenção, incluindo mas não limitadas a SEQ ID NOS:20-25, 31, 32-34, 43, e 238. Em ainda outras modalidades, pelo menos uma seqüência de peptídeos é selecionada dentre o grupo consistindo em YNLYGWT (SEQ ID NO:1), KYLYLYWW (SEQ ID NO:239), WYTLTKW (SEQ ID NO:240), TYRLYWW (SEQ ID NO:241), RYSLYYW (SEQ ID NO:242), YYLYYWK (SEQ ID NO:243), NYQLYGW (SEQ ID NO:244), TLWKSYW (SEQ ID NO:245), TKWPSYW (SEQ ID NO:246), PLWPSYW (SEQ ID NO:247), RLWPSYW (SEQ ID NO:248), TLWPKYW (SEQ ID NO:249), KYDLYWW (SEQ ID NO:33), RYDLYWW (SEQ ID NO:250), DYRLYWW (SEQ ID NO:251), DYKLYWW (SEQ ID NO:34), EYKLYWW (SEQ ID NO:252), e RYPLYWW (SEQ ID NO:253). Em algumas modalidades particularmente preferidas, a seqüência de peptídeos compreende o motivo especificado em SEQ ID NO:31. Em ainda outras modalidades, o esqueleto compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25.

Em outras modalidades adicionais, o inibidor de protease é selecionado dentre o grupo consistindo em inibidor de Bowman-Birk, inibidor de tripsina de soja, e inibidor de quimotripsina Elgin. Em algumas modalidades

particularmente preferidas, o inibidor de Bowman-Birk é um inibidor modificado de Bowman-Birk. Em outras modalidades, o esqueletocompreende de cerca de 0,001 por cento, em peso, a cerca de 5 por cento, em peso, da composição de cuidado pessoal, enquanto em modalidades alternativas, o esqueletocompreende de cerca de 0,01 por cento, em peso, a cerca de 2,0 por cento, em peso, da composição de cuidado pessoal, e em outras modalidades adicionais, o esqueletocompreende de cerca de 0,01 por cento, em peso, a cerca de 1 por cento, em peso, da composição de cuidado pessoal.

A presente invenção também provê composições de cuidado pessoal compreendendo composições de cuidado da pele. Em algumas modalidades preferidas, as composições de cuidado da pele são selecionadas dentre o grupo consistindo em cremes para pele, loções, pulverizações, emulsões, suspensões coloidais, espumas, aerossóis, líquidos, géis, soros, e sólidos. Em modalidades adicionais, as composições de cuidado da pele são líquidos umectantes de limpeza corporal, líquidos de limpeza corporal, limpadores antimicrobianos, cremes protetores da pele, loções corporais, cremes faciais, cremes umectantes, emulsões de limpeza facial, géis faciais, soros faciais, limpadores faciais à base de tensoativos, géis esfoliantes faciais, tratamentos antiacne, tonalizantes faciais, cremes esfoliantes, máscaras faciais, bálsamos pós-barba, bálsamos pré-barba, composições de bronzeamento, composições de clareamento da pele, composições redutoras de vermelhidão da pele, filtros solares, depilatórios, inibidores do crescimento de cabelo, e radioprotetores. Em modalidades adicionais, as composições de cuidado da pele compreendem composições aplicadas topicamente, de venda direta, tratamentos antifungos, tratamentos antiacne, protetores da pele, filtros solares, desodorantes, e antiperspirantes.

Em algumas modalidades preferidas, as composições de cuidado da pele são capazes de clarear a tonalidade da pele, enquanto em modalidades alternativas as composições de cuidado da pele são capazes de reduzir a vermelhidão na tonalidade da pele. Em ainda outras modalidades, as composições de cuidado da pele são capazes de evitar o escurecimento da tonalidade da pele, enquanto em modalidades adicionais, as composições

de cuidado da pele são capazes de evitar o desenvolvimento da cor da pele. Em algumas modalidades preferidas, as composições de cuidado da pele são radioprotetoras. Em modalidades alternativas, as composições de cuidado da pele compreendem pelo menos um radioprotetor. Em algumas modalidades particularmente preferidas, os radioprotetores são selecionados dentre o grupo consistindo em filtros solares. Em algumas modalidades mais preferidas, o filtros solares são selecionados dentre filtros solares não resistentes à água, filtros solares muito resistentes à água, e filtros solares água-em-silicone.

10 A presente invenção também provê composições de cuidado pessoal que são capazes de evitar o crescimento de cabelo. Em algumas modalidades, o cabelo é selecionado dentre o grupo consistindo em cabelo facial, pêlos das pernas, pêlos do braço, e pêlos do torso.

15 A presente invenção também provê composições de cuidado pessoal que são composições de cuidado do cabelo. Em algumas modalidades, a composição de cuidado do cabelo é selecionada dentre o grupo consistindo em xampus, condicionadores, composições para modelar o penteado do cabelo, colorantes para cabelo, formulações de ondas permanentes, cremes, géis, espumas, pulverizações, emulsões, suspensões coloidais, líquidos, espumas, e sólidos. Em outras modalidades, as composições de cuidado do cabelo compreendem pelo menos um radioprotetor. Em algumas modalidades preferidas, o radioprotetor é um filtro solar selecionado dentre filtros solares não resistentes à água, filtros solares muito resistentes à água, e filtros solares água-em-silicone. Em algumas modalidades, a composição
20 de cuidado do cabelo é radioprotetor.

25 A presente invenção ainda provê composições de cuidado pessoal que são composições de cuidado oral. Em algumas modalidades preferidas, as composições de cuidado oral são selecionadas dentre o grupo consistindo em pastas de dentes, géis de dentes, colutórios, líquidos para limpeza oral, composições anticáries, composições de branqueamento dos dentes, gomas de mascar, adesivos para dentaduras, e refrescantes bucais.

30 A presente invenção também provê composições de cuidado

pessoal que são composições cosméticas. Em algumas modalidades preferidas, as composições cosméticas são selecionadas dentre géis para os olhos, sombras para os olhos, batons de ponto de derretimento elevado, batons, brilhos para os lábios, bálsamos para os lábios, rímel, lápis para os
 5 olhos, formulações de pó compacto, e bases. Em algumas modalidades preferidas, as composições de maquiagem compreendem pelo menos um pigmento.

Em algumas modalidades preferidas, a composição de maquiagem compreendendo pelo menos um pigmento é um rímel selecionado dentre rímel não à prova d'água, rímel à prova d'água, rímel avolumador, rímel
 10 extensor, rímel enrolador, rímel anidro à prova d'água, rímel à base d'água, e tratamentos dos cílios e sobrancelhas.

Em outras modalidades adicionais, as composições de maquiagem são formulações de pó compacto selecionadas dentre pós soltos, *blushes*, sombras para os olhos, e pós de bronzamento. Em ainda outras modalidades, as composições de maquiagem são bases selecionadas dentre bases água-em-óleo, bases água-em-silicone, bases óleo-em-água, bastões anidros para maquiagem, e bases creme-a-pó.

A presente invenção ainda provê composições de cuidado pessoal tendo um suporte de esqueleto, em que o esqueleto compreende a sequência de aminoácidos especificada em SEQ ID NO:19. Em modalidades adicionais, o esqueleto ainda compreende a sequência de aminoácidos (s) especificada em SEQ ID NOS:20 e/ou 21. Em modalidades alternativas, a sequência de aminoácidos (s) especificada em SEQ ID NOS: 20 e/ou 21
 25 é/são substituída(s) por pelo menos um peptídeo tendo uma sequência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17. Em modalidades alternativas, qualquer uma das seqüências de peptídeos providas aqui encontra uso como uma substituição de SEQ ID NOS:20 e/ou 21. Em modalidades alternativas, qualquer uma das seqüências de peptídeos adicionais providas aqui encontra uso na presente invenção. Em outras modalidades, seqüências adicionais encontram uso na presente invenção, incluindo mas não limitadas a SEQ ID NOS:20-25, 31, 32-34, 43, e 238. Em
 30

ainda outras modalidades, a pelo menos uma sequência de peptídeos é selecionada dentre o grupo consistindo em YNLYGWT (SEQ ID NO:1), KY-
 YLYWW (SEQ ID NO:239), WYTLYKW (SEQ ID NO:240), TYRLYWW (SEQ
 ID NO:241), RYSLYYW (SEQ ID NO:242), YYLYYWK (SEQ ID NO:243),
 5 NYQLYGW (SEQ ID NO:244), TLWKSYW (SEQ ID NO:245), TKWPSYW
 (SEQ ID NO:246), PLWPSYW (SEQ ID NO:247), RLWPSYW (SEQ ID
 NO:248), TLWPKYW (SEQ ID NO:249), KYDLYWW (SEQ ID NO:33), RY-
 DLYWW (SEQ ID NO:250), DYRLYWW (SEQ ID NO:251), DYKLYWW (SEQ
 ID NO:34), EYKLYWW (SEQ ID NO:252), e RYPLYWW (SEQ ID NO:253).
 10 Em algumas modalidades particularmente preferidas, a sequência de peptí-
 deos compreende o motivo especificado em SEQ ID NO:31. Em ainda outras
 modalidades, o esqueletocompreende uma sequência de aminoácidos sele-
 cionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25.

A presente invenção também provê métodos para fabricar as
 15 composições de cuidado pessoal da presente invenção, compreendendo
 combinar uma quantidade efetiva do esqueletoe pelo menos um veículo ou
 excipiente fisiologicamente aceitável.

A presente invenção ainda provê métodos para modificar a tona-
 lidade da pele de um indivíduo, compreendendo as etapas de: prover pelo
 20 menos uma composição compreendendo a composição de cuidado pessoal
 da presente invenção; ii) prover um indivíduo a ser tratado; e aplicar a com-
 posição ao indivíduo em uma área em que modificações na tonalidade da
 pele do indivíduo é desejada. Em algumas modalidades, a modificação da
 tonalidade da pele compreende clarear a tonalidade da pele do indivíduo.
 25 Em algumas modalidades alternativas, a modificação da tonalidade da pele
 compreende reduzir a vermelhidão na tonalidade da pele do indivíduo. Em
 outras modalidades adicionais, os métodos compreendem a composição de
 cuidado pessoal compreendendo a sequência de aminoácidos especificada
 em SEQ ID NO:19. Em modalidades alternativas dos métodos, a composi-
 30 ção de cuidado pessoal compreende pelo menos uma das sequências de
 aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21. Em ainda outras moda-
 lidades dos métodos, pelo menos uma das sequências de aminoácidos es-

5 pecificada em SEQ ID NOS:20 e 21 é substituída por pelo menos um peptí-
 deo tendo uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo con-
 sistindo em SEQ ID NOS:1-17. Em modalidades alternativas, qualquer uma
 das seqüências de peptídeos adicionais providas aqui encontra uso como
 10 uma substituição de SEQ ID NOS:20 e/ou 21. Em outras modalidades, se-
 qüências adicionais encontram uso na presente invenção, incluindo mas não
 limitadas a SEQ ID NOS:20-25, 31, 32-34, 43, e 238. Em ainda outras moda-
 lidades, a pelo menos uma seqüência de peptídeos é selecionada dentre o
 grupo consistindo em YNLYGWT (SEQ ID NO:1), KYLYWW (SEQ ID
 15 NO:239), WYLYKW (SEQ ID NO:240), TYLYWW (SEQ ID NO:241),
 RYLYWW (SEQ ID NO:242), YLYWWK (SEQ ID NO:243), NYLYGW
 (SEQ ID NO:244), TLWKSYY (SEQ ID NO:245), TKWPSYY (SEQ ID
 NO:246), PLWPSYY (SEQ ID NO:247), RLWPSYY (SEQ ID NO:248),
 TLWPKYW (SEQ ID NO:249), KYDLYWW (SEQ ID NO:33), RYDLYWW
 20 (SEQ ID NO:250), DYLYWW (SEQ ID NO:251), DYLYWW (SEQ ID
 NO:34), EYLYWW (SEQ ID NO:252), e RYLYWW (SEQ ID NO:253). Em
 algumas modalidades particularmente preferidas, a seqüência de peptídeos
 compreende o motivo especificado em SEQ ID NO:31. Em ainda outras mo-
 dalidades, o esqueletocompreende uma seqüência de aminoácidos selecio-
 nada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25.

A presente invenção também provê métodos para modificar o
 crescimento de cabelo de um indivíduo, compreendendo as etapas de: pro-
 ver a composição de cuidado pessoal da presente invenção; prover um indi-
 víduo a ser tratado; e aplicar a composição ao indivíduo em uma área em
 25 que modificações no crescimento de cabelo do indivíduo são desejadas. Em
 algumas modalidades, a modificação do crescimento de cabelo compreende
 inibir o crescimento de cabelo do indivíduo, em que o cabelo a ser inibido é
 selecionado dentre o grupo consistindo em cabelo facial, pêlos das axilas,
 pêlos das pernas, pêlos do torso, e pêlos do braço, e cabelo da cabeça. Em
 30 outras modalidades adicionais, os métodos compreendem a composição de
 cuidado pessoal compreendendo a seqüência de aminoácidos especificada
 em SEQ ID NO:19. Em modalidades alternativas dos métodos, a composi-

ção de cuidado pessoal compreende pelo menos uma das seqüências de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21. Em ainda outras modalidades dos métodos, pelo menos uma das seqüências de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21 é substituída por pelo menos um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17. Em algumas modalidades alternativas, qualquer uma das seqüências de peptídeos adicionais providas aqui encontra uso como uma substituição de SEQ ID NOS:20 e/ou 21. Em outras modalidades, seqüências adicionais encontram uso na presente invenção, incluindo mas não limitadas a SEQ ID NOS:20-25, 31, 32-34, 43, e 238. Em ainda outras modalidades, a pelo menos uma seqüência de peptídeos é selecionada dentre o grupo consistindo em YNLYGWT (SEQ ID NO:1), KYLYWW (SEQ ID NO:239), WYTLKW (SEQ ID NO:240), TYRLWW (SEQ ID NO:241), RYSLYW (SEQ ID NO:242), YYLYWK (SEQ ID NO:243), NYQLYGW (SEQ ID NO:244), TLWKSyw (SEQ ID NO:245), TKWPSYW (SEQ ID NO:246), PLWPSYW (SEQ ID NO:247), RLWPSYW (SEQ ID NO:248), TLWPKYW (SEQ ID NO:249), KYDLYWW (SEQ ID NO:33), RYDLYWW (SEQ ID NO:250), DYRLWW (SEQ ID NO:251), DYKLYWW (SEQ ID NO:34), EYKLYWW (SEQ ID NO:252), e RYPLYWW (SEQ ID NO:253). Em algumas modalidades particularmente preferidas, a seqüência de peptídeos compreende o motivo especificado em SEQ ID NO:31. Em ainda outras modalidades, o esqueletocompreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê compostos cosméticos e/ou farmacêuticos para melhorar a aparência da pele compreendendo pelo menos um polipeptídeo ou um peptídeo. Em algumas modalidades preferidas, o polipeptídeo ou peptídeo liga a VEGF. Em modalidades alternativas, a ligação do polipeptídeo ou peptídeo a VEGF bloqueia a atividade a jusante do VEGF. Em algumas modalidades, os compostos compreendem pelo menos um peptídeo, enquanto em outras modalidades, os compostos compreendem pelo menos um polipeptídeo. Em algumas modalidades preferidas, o peptídeo tem uma seqüência de aminoácidos seleciona-

da dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17. Em ainda outras modalidades, o peptídeo tem uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em KYDLYWW (SEQ ID NO:33) e DYKLYWW (SEQ ID NO:34). Em modalidades preferidas adicionais, o peptídeo tem uma seqüência de ligação conservada, a seqüência sendo XXLWPXWC (SEQ ID NO:15). Em algumas modalidades preferidas, a seqüência compreende SEQ ID NO:15. Em outras modalidades, a seqüência compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17. Em outras modalidades, a seqüência compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25. Em modalidades preferidas alternativas, os compostos têm uma seqüência, a seqüência sendo pelo menos 70%, preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90%, e o mais preferivelmente 95% homóloga com as seqüências especificadas aqui. Em algumas modalidades preferidas, o polipeptídeo tem um peso molecular que está preferivelmente entre 500 Dáltons e 30.000 Dáltons, mais preferivelmente entre 1000 Dáltons e 10.000 Dáltons, e o mais preferivelmente de 1500 Dáltons a 8.000 Dáltons.

Em algumas modalidades preferidas, os compostos encontram uso na melhora da pele em um organismo (isto é, indivíduo) tendo um distúrbio de pele. Em algumas modalidades preferidas, o distúrbio de pele é um distúrbio de pele angiogênico. Em modalidades preferidas adicionais, o distúrbio de pele é pelo menos um selecionado dentre o grupo consistindo em psoríase, úlceras venosas, acne, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas e linfangiogênese, etc. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o distúrbio de pele é rosácea.

Em outras modalidades preferidas, a presente invenção provê compostos cosméticos e/ou farmacêuticos para melhorar a aparência da pele. Nestas modalidades preferidas, os compostos compreendem pelo menos um peptídeo ou polipeptídeo e pelo menos um suporte de esqueleto, o peptídeo ou polipeptídeo sendo expressados no suporte de esqueleto. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o pelo menos um peptídeo ou polipeptídeo é um laço. Em outras modalidades particularmente preferi-

das, o laço é fechado por uma ligação dissulfeto. Em algumas modalidades preferidas, o polipeptídeo ou peptídeo liga a VEGF. Em modalidades alternativas, a ligação do polipeptídeo ou peptídeo em VEGF bloqueia a atividade a jusante do VEGF. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o

5 peptídeo é expressado em um esqueletoresistente a protease. Em algumas modalidades especialmente preferidas, o esqueletoé um inibidor de protease (por exemplo, BBI, STI, ou inibidor de quimotripsina Elgin). Em algumas modalidades mais preferidas, o inibidor de protease é BBI.

Em algumas modalidades preferidas, os compostos ainda com-

10 preendem pelo menos um peptídeo. Preferivelmente, o peptídeo tem uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS: 1-17. O mais preferivelmente, os compostos compreendem uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25. Em algumas modalidades preferidas, o peptídeo tem uma

15 seqüência de ligação conservada, a seqüência sendo XXLWPXWC (SEQ ID NO:15). Em algumas modalidades preferidas, os compostos têm uma seqüência, a seqüência sendo pelo menos 70%, preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90%, e o mais preferivelmente 95% idêntica às seqüências especificadas aqui. O peso molecular do peptídeo está preferivelmente entre

20 500 Dáltons e 45,000 Dáltons, mais preferivelmente entre 1000 Dáltons e 12,000 Dáltons, e o mais preferivelmente de 1500 Dáltons a 10.000 Dáltons. Em algumas modalidades preferidas, os compostos compreendem pelo menos um polipeptídeo.

A presente invenção provê composições compreendendo pelo

25 menos um peptídeo selecionado dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17, em que o peptídeo liga a um fator de crescimento endotelial vascular. Em algumas modalidades preferidas, o peptídeo é expressado em um esqueletoresistente a protease. Em modalidades preferidas alternativas, o esqueletocompreende um inibidor de protease. Em algumas modalidades

30 mais preferidas, o inibidor de protease é selecionado dentre o grupo consistindo em inibidor de Bowman-Birk, inibidor de tripsina de soja, e inibidor de quimotripsina Elgin. Em algumas modalidades mais preferidas, o esqueletoé

inibidor de Bowman-Birk. Em ainda outras modalidades, o esqueletoresistente a protease e o peptídeo compreendem uma proteína de fusão. Em algumas modalidades particularmente preferidas, a composição compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em

5 SEQ ID NOS:22-25. Em modalidades adicionais, o esqueleto compreende a seqüência de aminoácidos especificada em SEQ ID NO:19. Em ainda outras modalidades, o esqueleto compreende pelo menos uma das seqüências de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21. Em outras modalidades

10 adicionais, pelo menos uma das seqüências de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21 é substituída por pelo menos um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17.

A presente invenção também provê composições cosméticas e/ou farmacêuticas compreendendo o, pelo menos, um peptídeo que liga a

15 um fator de crescimento endotelial vascular. Em algumas modalidades, a composição é capaz de modular a angiogênese. Em modalidades adicionais, a composição ainda compreende um esqueleto compreendendo um inibidor de protease. Em algumas modalidades preferidas, o inibidor de protease é selecionado dentre o grupo consistindo em inibidor de Bowman-Birk, inibidor

20 de tripsina de soja, e inibidor de quimotripsina Elgin. Em algumas modalidades preferidas, o esqueleto é inibidor de Bowman-Birk. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o esqueleto compreende a seqüência de aminoácidos especificada em SEQ ID NO:19. Em algumas modalidades alternativas, o esqueleto compreende pelo menos uma das seqüências de a-

25 minoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21. Em modalidades ainda preferidas, pelo menos uma das seqüências de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21 é substituída por pelo menos um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17.

30 A presente invenção também provê métodos para modular angiogênese compreendendo : i) prover uma composição compreendendo um peptídeo contido dentro de um suporte de esqueleto; ii) prover um indivíduo

a ser tratado; e iii) aplicar a composição ao indivíduo em uma área em que modulação de angiogênese é desejada. Em algumas modalidades, o peptídeo liga a um fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Em algumas modalidades preferidas, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é VEGF-A. Em modalidades ainda preferidas, o esqueleto é selecionado dentre o grupo consistindo em inibidor de Bowman-Birk, inibidor de tripsina de soja, e inibidor de quimotripsina Elgin. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o esqueleto é inibidor de Bowman-Birk. Em algumas outras modalidades, o esqueleto compreende a sequência de aminoácidos especificada em SEQ ID NO:19. Em ainda outras modalidades, o esqueleto compreende pelo menos uma das seqüências de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21. Em algumas modalidades particularmente preferidas, pelo menos uma das seqüências de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21 é substituída por pelo menos um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17. Em modalidades ainda mais particularmente preferidas, o esqueleto e o peptídeo são codificados por uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25.

A presente invenção também provê métodos para diminuir a atividade de um fator de crescimento endotelial vascular compreendendo as etapas de: i) prover um indivíduo; e ii) administrar a composição compreendendo pelo menos um peptídeo que liga ao fator de crescimento endotelial vascular ao indivíduo, sob condições tais que a atividade do fator de crescimento endotelial vascular é diminuída. Em algumas modalidades, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é VEGF-A. Em algumas modalidades particularmente preferidas, a composição compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25.

Em algumas modalidades preferidas adicionais, os compostos são usados para a melhora da pele em um organismo (isto é, um indivíduo) tendo um distúrbio de pele. Em modalidades preferidas adicionais, o distúrbio de pele é pelo menos um selecionado dentre o grupo consistindo em

psoríase, úlceras venosas, acne, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas e linfangiogênese, etc. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o distúrbio de pele é rosácea.

Em ainda outras modalidades, a presente invenção provê composições cosméticas e/ou farmacêuticas compreendendo pelo menos um polipeptídeo ou peptídeo, como especificado aqui, e um veículo ou excipiente fisiologicamente aceitável. Preferivelmente, o composto está presente em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 5% em peso com base no peso total da composição. Também preferivelmente, o composto está presente em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% em peso com base no peso total da composição. Composição pode estar na forma de um veículo emulsificado, como um creme ou loção nutriente, um gel estabilizado ou sistema de dispersão, um soro de tratamento, um sistema de distribuição lipossomal, uma máscara ou porção tópica, um sistema de limpeza à base de tensoativos como um xampu ou líquido de limpeza corporal, uma dispersão ou emulsão aerossolizada ou pulverizada, um condicionador da pele ou cabelo, auxiliar de penteado, ou um produto pigmentado como maquiagem, assim como outras preparações de maquiagem e cosméticas apropriadas. Em algumas modalidades, o veículo é preferivelmente pelo menos um selecionado dentre o grupo consistindo em água, propileno glicol, etanol, propanol, glicerol, butileno glicol e polietileno glicol.

Em ainda outras modalidades, a presente invenção provê meios para diminuir a atividade e/ou níveis de VEGF. Em algumas modalidades preferidas, a atividade e/ou níveis de VEGF são diminuídos na epiderme. Em algumas modalidades, o método compreende aplicar uma quantidade efetiva de pelo menos um dos compostos como aqui descritos em um organismo em necessidade do mesmo.

Em modalidades adicionais, a presente invenção provê aplicações para o tratamento de cabelo e/ou da pele, assim como aplicações cicatrização de feridas, tratamento de doenças proliferativas, etc. Assim, a presente invenção provê composições e métodos apropriados para aplicação em/ sobre seres humanos e outros animais.

Descrição das Figuras

Figura 1 apresenta um resumo de seqüências de clones de fagos de ligação a VEGF (SEQ ID NOS:1-12). Vinte e quatro clones de fagos foram seqüenciados após 3 ciclos de bateia. A árvore de alinhamento de seqüência indica um motivo de seqüência altamente conservado AC-XLWPXXWC (SEQ ID NO:14). O número em parênteses representa a frequência da seqüência dentro dos 24 clones seqüenciados após o terceiro ciclo de triagem por bateia.

Figura 2 apresenta resultados de um ELISA de fagos para demonstrar a ligação de clones únicos para VEGF e não para BSA. Equivalentes quantidades de fagos foram avaliados para determinar sua afinidade de ligação relativa para hVEGF₁₆₅. O número de clone e a seqüência randomizada (SEQ ID NOS:1-7, e 13) são indicados abaixo cada símbolo. Os fagos ligados a marcação foram detectados com anti-M13-HRP. O HRP foi monitorado com substrato ABTS em um A_{405nm} após 30 minutos ($n=3$).

Figura 3 apresenta resultados de uma análise de ligação BIA-CORE de peptídeo de ligação a VEGF. As curvas de ligação foram obtidos como descrito em Exemplos. Dados foram configurados a um modelo de reação de dois estados com mudança conformacional: Análito (A) liga a ligando (B) para formar complexo AB. Complexo AB muda para AB* que não pode dissociar diretamente em A + B. Painel A apresenta resultados para peptídeo biotilado CK37281. $k_{a1}=2,84e^3 M^{-1}s^{-1}$, $k_{d1}=0,0122 s^{-1}$, $k_{a2}=1,5e-3 s^{-1}$, $k_{d2}=3,36e^{-3} s^{-1}$, $K_D=1,92e^{-6} M$. Painel B apresenta resultados para CK37283 (6000 RU VEGF, 3500 RU TNF α sem tampão somente subtração); $k_{a1}=1,24e^4 M^{-1}s^{-1}$, $k_{d1}=0,318 s^{-1}$, $k_{a2}=6,34e-3 s^{-1}$, $k_{d2}=1,23e^{-3} s^{-1}$, $K_D=4,90e^{-6} M$. Painel C apresenta resultados para peptídeo de controle v114 (1000 RU VEGF, 850 RU TNF α). Dados foram configurados para 1:1 ligação Langmuir $k_{a1}=7,51e^5 M^{-1}s^{-1}$, $k_{d1}=0,167 s^{-1}$, $K_D=2,23e^{-7} M$.

Figura 4 apresenta mapas de plasmídeo usados nos Exemplos. Painel A apresenta o mapa para fagomídeo de expressão de pCB04WT para expressão de beta-lactamase etiquetada His6X C-terminal. Painel B apresenta o mapa para fagomídeo *stuffer* pME22 N-terminal para clonagem u-

sando sítios de restrição Bbs1. Painei C apresenta o mapa para fagomídeo de expressão de fusão pCM01 N-terminal aVEGF-BLA.

Figura 5 apresenta um resumo da estratégia de clonagem de fusão N-terminal usando sítios de clonagem Bbs1 (SEQ ID NOS:227-237).

5 Figura 6 apresenta um gel SDS-PAGE de fusões de beta-lactamase purificado de etiqueta His com peptídeos. Versões de BLA purificadas com IMAC e diferentes peptídeos foram concentrados e carregados sobre um gel SDS PAGE (4-12%). Trilhas 1 & 10: marcadores MW. Trilha 2: pCB04 (WT com etiqueta 6Xhis); Trilhas 3,4,5,6: pCM01 um esqueleto de
10 proteína de fusão N-terminal VEGF-BLA e Trilhas 7,8: proteína de fusão pCM02 a quimotripsina-BLA N-terminal.

Figura 7 apresenta um gráfico mostrando que a fusão aVEGF peptídeo-BLA liga especificamente a VEGF. Concentrações aumentadas de pCM01 (fusão de peptídeo aVEGF -BLA) e pCB04 (WT) foram adicionadas a
15 cavidades revestidas com VEGF de uma placa de microtitulação. A atividade de nitrocefina ligada residual foi medida após lavagem 5X com tampão de teste de nitrocefina (0,125% n-octil-beta-D-glucopiranosídeo em PBS).

Figura 8 apresenta um gráfico mostrando inibição de proliferação de HUVEC induzida por VEGF por peptídeo anti-VEGF (círculos cheios).
20 Proliferação foi monitorada por incorporação radioativa de ³H timidina (n = 3). Anticorpo anti-VEGF (círculos abertos) foi usado como um controle positivo, como descrito nos Exemplos.

Figura 9 apresenta o gene BBI e seqüências de aminoácidos (SEQ ID NOS:18 e 19, respectivamente) projetados para eficiente clonagem.
25 Esta seqüência compreende o cassete de expressão usado em *E.coli*. Ela codifica a proteína pro-BBI com uma etiqueta C-terminal His e tem seqüências extras nas extremidades 5' e 3' para clonagem no vetor de expressão de *E. coli*. A seqüência de sinal de proteína está em itálico enquanto o laço de tripsina (CTKSNPPQC; SEQ ID NO:20) e o laço de quimotripsina
30 (CALSYPACQ; SEQ ID NO:21) são realçados em negrito e em caixas.

Figura 10 apresenta um gel SDS PAGE mostrando resultados de reduplicação de BBI anti-VEGF. BBI anti-VEGF foi reduplicado na presença

ou ausência de subtilisina BPN' Y217L. As trilhas são as seguintes: Trilha 1: tampão de reduplicação Hampton Foldit 11, -subtilisina; Trilha 2: tampão de reduplicação Hampton Foldit 11, +subtilisina; Trilha 3: tampão de reduplicação Hampton Foldit 13, -subtilisina; Trilha 4, tampão de reduplicação Hampton Foldit 13, + subtilisina; e Trilha 5, marcadores de peso molecular.

Figura 11 apresenta um gráfico mostrando que BBI-VEGF1 (SEQ ID NO:22) liga especificamente a VEGF.

Figura 12 apresenta um gráfico mostrando resultados HUVEC para peptídeos projetados.

Figura 13 apresenta seqüências de três fusões de BBI-VEGF, BBI-VEGF1 (SEQ ID NO:22), BBI-VEGF2 (SEQ ID NO:23) e BBI-VEGF12 (SEQ ID NO:24). Fusões BBI-VEGF1 e BBI-VEGF2 tem somente um dos laços de ligação substituído, fusão BBI-VEGF12 tem ambos os laços de ligação substituídos.

Figura 14 apresenta as seqüências de DNA e de aminoácidos do cassete de expressão *aprE*-BCE103-BBI-Histag (*EcoRI*-*HindIII*) clonado no vetor de integração pJM103 (SEQ ID NOS:35 e 36).

Figura 15 apresenta uma mapa esquemático do vetor de expressão de pJM103BBIhis.

Figura 16 apresenta as seqüências de DNA e de aminoácidos de 12BBIck81 do sítio de fusão BCE103 (em *Bam*HI) na extremidade do gene (SEQ ID NOS:37 e 38). As seqüências CK37281 de peptídeos (ACYN-LYGWTC (SEQ ID NO:43)) são inseridas tanto nos laços inibidores de tripsina como de quimotripsina.

Figura 17 apresenta um gráfico mostrando títulos de 2BBIck81 ativos versus inativos (por inibição de tripsina) e a relação das atividades de BCE103 celulase para 2BBck81 com vários agentes redutores de tiol adicionados durante o crescimento da cultura. Nesta Figura, BME = 2-mercaptoetanol, Cyt = cisteína, Glut = glutathiona reduzida, DTT = ditioneitol).

Figura 18 apresenta um gráfico mostrando ativação de BCE-Ink2-2BBIck81 com 2-mercaptoetanol (bME) após a purificação parcial por cromatografia de troca iônica.

Figura 19 apresenta um gráfico mostrando resultados de uma análise de competição de 2BBlck81 versus ligação de anticorpo anti-VegF para VegF.

Figura 20 apresenta a sequência do fragmento de DNA sintético transportando *H. insolens* PDI-(hiPDI) que foi inserido no vetor de expressão de *B. subtilis* BBI, assim como a sequência de aminoácidos (SEQ ID NOS:39 e 40)

Figura 21 apresenta as sequências de DNA e de aminoácidos do *aprE*-cutinase cassette de expressão que foi ligado nos sítios *EcoRI*-*BamHI* de p2JM103-Ink2-2BBlck81 (SEQ ID NOS:41 e 42).

10 Descrição da Invenção

A presente invenção provê peptídeos e peptídeos suportados para tratar várias doenças e condições. Em modalidades particularmente preferidas, a presente invenção provê composições e métodos de cuidado pessoal. Em algumas modalidades, a presente invenção provê composições para uso em cuidado da pele e/ou do cabelo, assim como composições cosméticas. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, a presente invenção provê peptídeos e peptídeos suportados para tratar doenças da pele, como rosácea. Em algumas modalidades particularmente preferidas, os peptídeos suportados da presente invenção são peptídeos anti-VEGF. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, os peptídeos anti-VEGF são expressados em uma proteína do esqueleto. Em algumas modalidades mais preferidas, o proteína esquelotocompreende BBI.

Como descrito em maiores detalhes aqui, a presente invenção provê composições para uso em numerosos aspectos de cuidado pessoal, incluindo mas não limitadas cuidado do cabelo e pele, assim como cosméticos (por exemplo, maquiagem). Por exemplo, a presente invenção provê composições que encontram uso em cuidado pessoal diário, cuidado da pele, cuidado do sol (por exemplo, filtros solares, assim como bronzeadores), cuidado do cabelo (por exemplo, xampus, condicionadores com e sem enxágüe, tônicos para cabelo, pulverizações para cabelo, géis, espumas, espumas, produtos para fixar, colorantes para cabelo, formulações permanentes, outros produtos de limpeza e para modelar o penteado, etc.), cuidado

após a exposição ao sol à pele, cabelo e lábios, cuidado oral (por exemplo, pastas de dentes e géis, líquidos para limpeza oral, enxágües, etc.), banhos (por exemplo, líquidos de lavagem, sabões para chuveiro, sabões para banho, sais, pérolas, etc.), clareadores da pele, tratamentos de limpeza para condições da pele (por exemplo, espinhas, acne, tonalizantes da pele, etc.), depilatórios, lenços úmidos, desodorantes, antiperspirantes, máscaras faciais, barbear (por exemplo, cremes barbear, géis, etc.), pós-barbear, descamação da pele (por exemplo, esfoliantes), produtos de cuidado íntimo (por exemplo, produtos de higiene feminina), refrescantes pessoais, cuidado dos pés. A presente invenção também provê composições que encontram uso em cosméticos (por exemplo, bases, rímel, sombras para os olhos, lápis de olho, batons, brilhos para os lábios, *blushes*, etc.). Contempla-se que as composições da presente invenção irão encontrar uso em várias formas, incluindo mas não limitadas a sólidos, líquidos, suspensões coloidais, emulsões, óleos, géis, aerossóis, espumas, pós, pulverizações de bomba, etc., assim como sendo usados em conjunto com itens como lenços úmidos, etc. De fato, contempla-se que a presente invenção irá encontrar uso em qualquer forma apropriada para o(s) uso(s) pretendido (s).

Salvo indicado de outra forma, a prática da presente invenção envolve técnicas convencionais comumente usadas em biologia molecular, microbiologia, e DNA recombinante, que são conhecidos do versado. Estas técnicas são conhecidas do versado e são descritos em numerosos textos e trabalhos de referência (Ver por exemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2a. ed. (Cold Spring Harbor), [1989]); e Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology" [1987]). Todas as patentes, pedidos de patentes, artigos e publicações mencionados aqui, tanto *supra* como *infra*, são assim expressamente incorporados aqui por referência.

Salvo indicado de outra forma aqui, todos os termos técnicos e científicos usados aqui tem o mesmo significado como comumente conhecidos do versado na técnica à qual a invenção pertence. Por exemplo, Singleton e Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2d Ed., John Wiley e Sons, NY (1994); e Hale e Marham, *The Harper Collins Dictio-*

nary of Biology, Harper Perennial, NY (1991) proporcionam aos versados na técnica com dicionários gerais de muitos dos termos usados na invenção. Apesar de quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes aos como aqui descritos encontrem uso na prática da presente invenção, os métodos e materiais preferidos são como aqui descritos. Assim, os termos definidos imediatamente abaixo são os mais completamente descritos por referência ao relatório como um todo. Também, como usado aqui, o singular "o" "a" e "um" incluem a referência no plural, salvo especificado em contrário claramente. As faixas numéricas são inclusivas dos números definidos na faixa. Salvo especificado em contrário, os ácidos nucleicos são escritas da esquerda à direita em orientação 5' para 3', as seqüências de aminoácidos são escritas da esquerda à direita em orientação amino para carbóxi, respectivamente. Será entendido que a invenção não é limitada à metodologia particular, protocolos, e reagentes descritos, como estes podem variar, dependendo do contexto onde são usados pelos versados na técnica.

Além disso, os cabeçalhos providas aqui não são limitações dos vários aspectos ou modalidades da invenção que podem ter referência ao relatório como um todo. Assim, os termos definidos imediatamente abaixo são mais completamente definido por referência ao relatório como um todo. Mesmo assim, a fim de facilitar a compreensão da invenção, vários itens são definidos abaixo.

Definições

Como usado aqui, o termo esqueletorefere-se a um inibidor de protease tendo uma seqüência de peptídeos heteróloga e/ou modificada incorporada aqui. Em modalidades preferidas, o termo esqueletorefere-se a uma seqüência de proteína de tipo selvagem, em que uma seqüência variante é introduzida. Em algumas modalidades, o esqueletotem porções (por exemplo, partes ou todos de um ou ambos laços), que são substituídos com seqüência(s) heteróloga(s). Por exemplo, as seqüências BBI tendo seqüências anti-VEGF (AV) incorporadas como aqui provido, encontram uso como "suportes "scaffold". De fato, a presente invenção engloba seqüências à base de BBI, mas que tem diferenças estruturais e funcionais de BBI de tipo

selvagem.

Como usado aqui, o termo "fator de crescimento endotelial vascular" (VEGF) refere-se a proteínas com a capacidade de estimular o crescimento vascular, incluindo os designados "VEGF-A" como conhecido dos versados na técnica.

Como usado aqui, o termo "anti-VEGF" ("aVEGF" e "AV") refere-se a peptídeos e outras composições que reconhecem, (isto é, ligam) a VEGF. Em modalidades preferidas, estes peptídeos/composições modulam a atividade de VEGF.

O termo "angiogênese" refere-se aos processos biológicos que resultam no desenvolvimento de vasos sangüíneos e/ou aumentam a vascularidade de tecido em um organismo. Em modalidades particulares aqui, o termo refere-se ao processo através do qual os tumores ou outros tecidos de rápida proliferação derivam um suprimento de sangue através da geração de microvasos.

Os termos "doença angiogênica", "distúrbio angiogênico", e "distúrbio angiogênico de pele", são usados em referência a um distúrbio, geralmente um distúrbio de pele ou distúrbio relacionado que ocorre como uma consequência de ou que resulta em vascularização aumentada em tecido. Com freqüência, a etiologia da doença angiogênica é desconhecida. No entanto, se a angiogênese for uma causa real de um estado doentio ou é simplesmente uma condição do estado doentio não é importante, mas da inibição de angiogênese no tratamento ou reversão de um estado doentio ou condição é um aspecto importante da presente invenção. Assim, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer mecanismo particular de ação. Exemplos de distúrbios angiogênicos de peles que são apropriados para tratamento utilizando compostos da presente invenção incluem, mas não são limitados a psoríase, acne, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas e linfangiogênese, síndrome de Sturge-Weber, neurofibromatose, esclerose tuberosa, doença inflamatória crônica, e artrite. Qualquer distúrbio de pele que tem como uma caracterização primária ou secundária, vascularização aumentada, é considerado um distúrbio de pele angiogênico

aqui. Assim, os compostos providos pela presente invenção encontram uso no tratamento de uma ampla variedade de doenças e/ou condições.

O termo "rosácea" é usado para descrever acne, rosácea, ou eritematosa caracterizados por dilatação vascular e folicular tipicamente envolvendo o nariz e porções contíguas das bochechas. A rosácea pode variar de muito branda, mas hiperplasia persistente a extensivas das glândulas sebáceas a pápulas profundas e pustúlas e pode ser acompanhada por telangiectasia dos sítios eritematosos afetados. Esta condição é também referida como "rosácea hipertrófica" ou "rinofima", dependendo da severidade da condição. Pretende-se que o termo englobe todas as várias formas da condição.

O termo "verruga" é usado para descrever crescimento pequeno, geralmente duro sobre a pele. Também conhecido como "verruca", verrugas são crescimentos da cor da pele que são caracterizados por hipertrofia circunscrita das papilas do cório, com espessamento das camadas de malpighiano, granulação e ceratina da epiderme. Verruca vulgaris, um subconjunto de verrugas ou verruca, é caracterizada por infecção dos queratinócitos por papilomavírus humano.

O termo "psoríase" é usado para descrever uma condição da pele que é caracterizada pela erupção de maculopápulas circunscritas, discretas e confluentes, avermelhadas, com escamas prateadas. Apesar de não se pretender que a presente invenção seja limitada a qualquer área corporal particular, lesões psoriáticas tipicamente ocorrem nos cotovelos, joelhos, couro cabelo e tronco. Microscopicamente, estas lesões demonstram paraqueratose característica e alongamento das cristas do plexo.

O termo "acne" é usado para descrever uma condição da pele caracterizada por erupções inflamatórias foliculares, papulares e pustulares envolvendo o aparelho sebáceo. Apesar de existirem numerosas formas de acne, a mais comum é conhecida como acne simplex ou acne vulgaris que é caracterizada por erupções da face, dorso superior e peito, primariamente compreendendo comedones, cistos, pápulas e pústulas em uma base inflamatória. A condição ocorre primariamente durante puberdade e adolescência.

cia devido a um aparelho sebáceo superativo que se acredita seja afetado pela atividade hormonal.

O termo "eczema" é um termo genético usado para descrever condições inflamatórias agudas ou crônicas da pele, tipicamente eritemato-
5 so, edematoso, papular, vesicular e/ou formação de cascas. Estas condições são com frequência seguidas por liquenificação, formação de escamas e ocasionalmente, por escurecimento do e, com pouca frequência, hiperpigmentação. Eczema é com frequência acompanhado por uma seção de coceira e queimação. As vesículas dos eczemas se foram devido a espongiose
10 intraepidérmico. Eczema é às vezes referido coloquialmente como "herpes da pele", "herpes seco" e "herpes com escamas". Existem numerosas subcategorias de eczema, sendo todas tratadas por um ou mais dos compostos de acordo com a presente invenção.

Como usado aqui, "CK" seguido por um número inteiro refere-se
15 a um peptídeo específico. Várias seqüências de peptídeos que encontram uso com a presente invenção são providas aqui (Ver por exemplo, Figura 1). Como um exemplo, CK37281 refere-se a uma seqüência de peptídeos YN-LYGWT (SEQ ID NO:1) que é também é incluída em várias outras seqüências (por exemplo, "ACYNLYGWTCGGG" (SEQ ID NO:238).

20 Como usado aqui, em algumas modalidades, o "composto" compreende a proteína "completa", (isto é., em seu comprimento completo como ele ocorre em natureza (ou como mudado)), enquanto em outras modalidades compreende uma forma truncada de uma proteína. Assim, em algumas modalidades, os compostos da presente invenção são ou truncados
25 ou de "comprimento completo." Além disso, em algumas modalidades, a truncagem está localizada na extremidade N-terminal, enquanto em outras modalidades a truncagem está localizada na extremidade C-terminal da proteína. Em outras modalidades, o composto falta uma ou mais porções (por exemplo, subsequências, seqüências de sinal, domínios ou porções), seja
30 ativo ou não.

O termo "organismo" é usado em todo o relatório para descrever um animal, preferivelmente um ser humano, ao qual o tratamento, incluindo

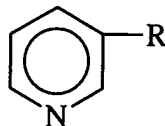
tratamento profilático, com os compostos de acordo com a presente invenção é provido. Para tratamento destas infecções, condições ou estados doentes que são específicos para um animal específico, como um paciente humano, o termo organismo refere-se a este animal específico.

5 As "células hospedeiras" usadas na presente invenção geralmente são hospedeiros procarióticos ou eucarióticos que contêm um vetor de expressão e/ou gene de interesse. Células hospedeiras são transformadas ou transfectadas com vetores construídos usando técnicas de DNA recombinante. Estas células hospedeiras transformadas são capazes de ou
10 replicar vetores codificando variantes de proteína ou expressando a desejada variante de proteína. Nos casos de vetores que codificam a pre- ou pre-pro-forma de uma variante de proteína, estas variantes, quando expressadas, são tipicamente secretadas da célula hospedeira para dentro do meio de célula hospedeira.

15 O termo "quantidade efetiva" é usado em todo o relatório para descrever concentrações ou quantidades de compostos de acordo com a presente invenção que podem ser usados para produzir uma mudança favorável na doença ou condição tratada, seja a mudança de crescimento de cabelo ou prevenção de crescimento de cabelo.

20 Como usado aqui, "ativo" (e "ativos") refere-se a uma composição que confere um benefício a um indivíduo sendo tratado. Por exemplo, em modalidades preferidas, a presente invenção provê composições de cuidado pessoal compreendendo BBI-AV, um "ativo primário" que funciona para proporcionar benefício à área em que é aplicado. Assim, em algumas modalidades, BBI-AV está presente em formulações de cuidado da pele e serve
25 para modificar a tonalidade da pele de indivíduos ao qual é aplicado. Não se pretende que o termo seja limitado a BBI-AV, porque existem adicionais constituintes presente nas composições de cuidado pessoal da presente invenção que conferem benefícios. Em algumas modalidades preferidas, estes
30 constituintes adicionais são englobados pela designação "ativos secundários." Ativos primários e secundários são coletivamente referidos como "ativos" aqui.

Como usado aqui, "composto de vitamina B₃" significa um composto tendo a fórmula:



em que R é - CONH₂ (isto é, niacinamida), - COOH (isto é, ácido nicotínico) ou - CH₂OH (isto é, álcool nicotinílico); seus derivados; e sais de qualquer

5 um dos acima.

Como usado aqui, "não vasodilator" significa que um éster não dá comumente uma resposta de rubor visível após aplicação na pele das presentes composições. Contempla-se que a maior parte da população geral não deve experimentar uma resposta de rubor visível, apesar dos compostos
10 poderem causar vasodilação não visível a olho nu.

Como usado aqui, "retinóide" inclui todos os análogos naturais e/ou sintéticos de Vitamina A e/ou compostos similares a retinol que possuem a atividade biológica de Vitamina A em/sobre a pele, assim como os isômeros geométricos e estereoisômeros destes compostos. No entanto, não
15 se pretende que o termo seja limitado a estes compostos, como o termo engloba álcool de vitamina A (retinol) e seus derivados como aldeído de vitamina A (retinal), ácido de vitamina A (ácido retinóico) e ésteres de vitamina A (por exemplo, acetato de retinila, propionato de retinila e palmitato de retinila), etc. Pretende-se ainda que o termo englobe ácidos retinóico todo-trans e
20 ácidos 13-cis- retinóicos. Pretende-se também que o termo englobe composições que são encapsuladas assim como providas para uso em várias formas. Os termos "retinol" e "retinal" preferivelmente compreendem os compostos todos-trans. Os retinóides preferivelmente usados para a formulação da presente invenção é todo-trans-retinol, geralmente referido como "retinol"
25 aqui.

Como usado aqui, "carotenóide" é usado em referência a β-caroteno, licopeno, luteína, astaxantina, zeaxantina, criptoxantina, citranaxantina, cantaxantina, bixina, β-apo-4-carotenal, β-apo-8-carotenal, ésteres β-apo-8-carotenóicos, sozinhos, assim como em combinação. Carotenóides
30 que são preferivelmente usados são β-caroteno, licopeno, luteína, astaxanti-

na, zeaxantina, citranaxantina e cantaxantina. Em algumas modalidades, carotenóides são utilizados em forma cristalina, assim como em formulações, incluindo mas não limitadas a pós secos (Ver por exemplo, pós secos, como descrito em EP 0 065 193; aqui incorporado por referência).

5 Em algumas modalidades, o uso preferido nos casos de licopeno, astaxantina e cantaxantina é um pó seco contendo licopeno-, astaxantina- e cantaxantina, por exemplo LYCOVIT[®], LUCANTIN[®] Pink e LUCANTIN[®] Vermelho (pós 10% secos respectivamente de licopeno, astaxantina e cantaxantina, comercialmente disponíveis de BASF AG, Ludwigshafen, Ger-

10 many.

 Como usado aqui, o termo "bioatividade" refere-se uma relação de causa e efeito entre a composição e um sistema biológico. Assim, o termo é usado pelos versados na técnica de biotecnologia e ciências biológicas como a expressão que descreve uma relação de causa e efeito entre uma

15 composição molecular e um material biológico vivo (por exemplo, tecido, células, etc.).

 Como usado aqui como um nome, o termo "bioativo" refere-se a uma composição que demonstra bioatividade quando de administração a um material biológico vivo (por exemplo, tecido, células, etc.). O termo é usado

20 como sinônimo com "composto bioativo."

 Como usado aqui, "goma de silicone" significa silicones de peso molecular elevado tendo um peso molecular médio em excesso de cerca de 200.000 e preferivelmente de cerca de 200.000 a cerca de 4,000.000. Pretende-se que a definição englobe gomas de polialquil e poliaril siloxano não

25 voláteis.

 Como usado aqui, o termo "polipeptídeo" refere-se a um composto feito de uma cadeia única de resíduos de aminoácidos ligados por ligações de peptídeo. O termo "proteína" aqui pode ser sinônimo com o termo "polipeptídeo" ou pode fazer referência, além disso, a um complexo de dois

30 ou mais polipeptídeos. O significado exato é conhecido dos versados na técnica.

 Como usado aqui, os termos "cassete de expressão" e "vetor de

expressão" referem-se a constructos de ácido nucléico geradas recombinante ou sinteticamente, com séries de elementos de ácido nucléico especificados que permitem a transcrição de um particular ácido nucléico em uma célula alvo. O cassete de expressão recombinante pode ser incorporado em um plasmídeo, cromossomo, DNA mitocondrial, DNA plastídio, vírus, ou
5 fragmento de ácido nucléico. Tipicamente, a porção recombinante do cassete de expressão de um vetor de expressão inclui, dentre outras seqüências, uma seqüência de ácido nucléico a ser transcrita e um promotor. O termo "cassete de expressão" pode ser usado interpermutavelmente aqui com
10 "constructo DNA" e seus equivalentes gramaticais.

Como usado aqui, os termos "vetor" e "vetor de clonagem" referem-se a constructos de ácido nucléico projetadas para transferir as seqüências de ácido nucléico em células.

Como usado aqui, o termo "vetor de expressão" refere-se a um
15 vetor que tem a capacidade de incorporar e expressar fragmentos de DNA heterólogos em uma célula estranha. Muitos vetores de expressão procarióticos e eucarióticos são comercialmente disponíveis. Seleção de apropriados vetores de expressão está de acordo com o conhecimento dos versados na técnica.

20 Como usado aqui, o termo "plasmídeo" refere-se a constructos de DNA circulares de filamento duplo (ds) usadas como um vetor de clonagem, e que formam um elemento genético auto-replicante extracromossomal em alguns eucariotes ou integram no hospedeiro os cromossomos.

Como usado aqui, o termo "expressão" refere-se ao processo
25 pelo qual um polipeptídeo é produzido com base na seqüência de ácido nucléico do gene ou dos peptídeos sintéticos químicos. O processo inclui tanto a transcrição como a tradução do gene para produzir polipeptídeo/proteína.

Como usado aqui, o termo "gene" significa o segmento de DNA envolvido em produção de uma cadeia de polipeptídeo que pode ou não incluir regiões precedentes ou após a região de codificação.
30

Como usado aqui, os termos "molécula de ácido nucléico" e "seqüência de ácido nucléico" incluem seqüências de qualquer forma de ácido

nucléico, incluindo, mas limitadas a moléculas de RNA, DNA e cDNA. Será entendido que, como um resultado da degenerescência do código genético, uma multiplicidade de seqüências nucleotídicas codificando uma dada proteína pode ser produzido, além dos mutantes de proteínas.

5 Como usado aqui, "códon" refere-se a uma seqüência de três nucleotídeos em uma molécula de DNA ou mRNA que representa a instrução para incorporação de um aminoácido específica em uma cadeia de polipeptídeo.

10 Como usado aqui, o termo "ponte dissulfeto" ou "ligação dissulfeto" refere-se a uma ligação formada entre os átomos de enxofre de resíduos de cisteína em um polipeptídeo ou uma proteína. Nesta invenção, uma ponte dissulfeto ou ligação dissulfeto pode estar ocorrendo não naturalmente e introduzida por meio de mutação por pontos.

15 Como usado aqui, o termo "ponte de sal" refere-se a uma ligação formada entre resíduos carregados de modo oposto, aminoácidos em um polipeptídeo ou proteína. Nesta invenção, uma ponte de sal pode estar ocorrendo não naturalmente e ser introduzida por meio de mutação por pontos.

20 Como usado aqui, uma "enzima" refere-se a uma proteína ou polipeptídeo que catalisa pelo menos uma reação química.

25 Como usado aqui, o termo "atividade" refere-se a qualquer atividade associada com uma proteína particular, como atividade enzimática associada com a protease. Em algumas modalidades, a atividade é atividade biológica. Em outras modalidades, atividade engloba a ligação de proteínas a receptores que resulta em efeitos a jusante mensuráveis (por exemplo, ligação de VEGF a seu receptor cognato). "Atividade biológica" refere-se a qualquer atividade que seria normalmente atribuída a esta proteína por um versados na técnica.

30 Como usado aqui, o termo "protease" refere-se a uma enzima que degrada as ligações peptídeo.

 Como usado aqui, "ligação peptídeo" refere-se à ligação química entre grupo carbonila de um aminoácido e o grupo amino de outro aminoáci-

do.

Como usado aqui, "tipo selvagem" refere-se a uma seqüência ou uma proteína que é nativa ou ocorrendo naturalmente.

5 Como usado aqui, "mutações em pontos" refere-se a uma mudança em um nucleotídeo o único de DNA, especialmente onde a mudança resulta em uma mudança de seqüência em uma proteína.

10 Como usado aqui, "mutante" refere-se a uma versão de um organismo ou proteína onde a versão é diferente da do tipo selvagem. A mudança pode ser efetuada por métodos bem-conhecidos dos versados na técnica, por exemplo, mutação por pontos em que a proteína resultante pode ser referida como um mutante.

15 Como usado aqui, "mutagênese" refere-se ao processo de mudança de uma composição (por exemplo, proteína) de uma composição de tipo selvagem (por exemplo, proteína) em uma composição mutante ou variante (por exemplo, proteína).

Como usado aqui, "substituído" e "substituições" referem-se a substituição(s) de um resíduo de aminoácidos ou base de ácido nucléico base em uma seqüência parental. Em algumas modalidades, a substituição envolve a substituição de um resíduo ou base naturalmente ocorrendo.

20 Como usado aqui, "modificação" e "modificar" referem-se a qualquer mudança(s) em uma seqüência de aminoácido ou ácido nucléico, incluindo, mas não limitado a deleções, inserções, interrupções, e substituições. Em algumas modalidades, a modificação envolve a substituição de um resíduo ou base naturalmente ocorrendo.

25 Como usado aqui, "porção funcional de um polipeptídeo secretado" e seus equivalentes gramaticais referem-se a polipeptídeo secretado truncado que retém sua capacidade de duplicar em uma configuração normal, apesar de truncada. Em algumas modalidades, contempla-se que resíduos suficientes de um domínio do polipeptídeo naturalmente secretado deve estar presente para permitir que ele duplique em sua configuração normal
30 independentemente do polipeptídeo desejado ao qual ele é fixado. No entanto, na maior parte dos casos, a porção do polipeptídeo secretado é tanto cor-

retamente duplicada como resulta em secreção aumentada como comparado com sua ausência. Similarmente, na maior parte dos casos, a truncagem do polipeptídeo secretado significa que a porção funcional retém uma função biológica. Em uma modalidade preferida, o domínio catalítico de um polipeptídeo secretado é usado, apesar de outros domínios funcionais poderem ser usados, por exemplo, os domínios de ligação de substrato. Adicionalmente, modalidades preferidas usam o domínio catalítico e toda ou parte da região do ligante.

Como usado aqui, "laço" refere-se a uma seqüência de aminoácidos, por exemplo 3-20 aminoácidos, mais preferivelmente 5-15 aminoácidos, ainda mais preferivelmente 5-10 aminoácidos, e o mais preferivelmente 7-9 aminoácidos, que conecta elementos estruturais de uma proteína. Estes elementos incluem, mas não são limitados a folhas beta e elementos helicoidais e o laço de conexão de uma beta-"grampo de cabelo" Em algumas modalidades, o laço é ainda estabilizado através do uso de ligações covalentes. Em algumas modalidades preferidas, as ligações covalentes compreendem ligações dissulfeto, especialmente como aqui provido. Em modalidades alternativas, os laços são estabilizados pelo uso de outros meios, incluindo mas não limitadas a amidas, ligações hidrogênio, e/ou ponte de sais. Em outras modalidades, os laços estão localizados na superfície de proteínas e podem ser alterados, como aqui provido, para conferir propriedades adicionais (por exemplo, desejáveis) às proteínas requeridas.

Como usado aqui, "oligonucleotídeo" refere-se a uma seqüência nucleotídica curta que pode ser usada, por exemplo, como um iniciador em uma reação usada para criar mutantes de proteínas.

Como usado aqui, os termos "um oligonucleotídeo tendo uma seqüência nucleotídica codificando um gene" e "polinucleotídeo tendo uma seqüência nucleotídica codificando um gene", significa uma seqüência de ácido nucléico compreendendo a região de codificação de um gene ou, em outras palavras, a seqüência de ácido nucléico que codifica um produto de gene. A região de codificação pode estar presente em forma de cDNA, DNA genômico ou RNA. Quando presente em uma forma de DNA, o oligonucleo-

tídeo ou polinucleotídeo pode ser de filamento único (isto é, o filamento sentido) ou filamento duplo. Os elementos de controle como melhoradores/promotores, junções de emenda, sinais de poliadenilação, *etc.* podem ser colocados em proximidade íntima à região de codificação do gene se
5 necessário para permitir a iniciação apropriada de transcrição e/ou processamento correto do transcrito de RNA primário. Alternativamente, a região de codificação utilizado no vetor de expressão da presente invenção por conter melhoradores/promotores endógenos, junções de emenda, seqüências de intervenção, sinais de poliadenilação, *etc.* ou uma combinação de
10 elementos de controle tanto endógenos como exógenos.

Como usado aqui, o termo "iniciador" refere-se a um oligonucleotídeo, ou ocorrendo naturalmente como em um digesto de restrição purificado ou produzido sinteticamente, que é capaz de atuar como um ponto de
15 iniciação de síntese quando colocado sob condições em que síntese de um produto e extensão de iniciador que é complementar a um filamento de ácido nucléico é induzida, (isto é, na presença de nucleotídeos e um agente indutor como DNA polimerase e em temperatura e pH apropriados). O iniciador é preferivelmente de filamento único para uma eficiência máxima em amplificação, mas alternativamente pode ser de filamento duplo. Se de filamento
20 duplo, o iniciador é primeiro tratado para separar seus filamentos antes de serem usados para preparar produtos de extensão. Preferivelmente, o iniciador é um oligodesoxirribonucleotídeo. O iniciador deve ser suficientemente longo para iniciar a síntese de produtos de extensão na presença do agente indutor. O comprimento exato dos iniciadores irá depender de muitos fatores,
25 incluindo temperatura, fonte de iniciador e o uso do método.

Como usado aqui, o termo "sonda" refere-se a um oligonucleotídeo (isto é, uma seqüência de nucleotídeos), ou ocorrendo naturalmente como em um digesto de restrição purificado ou produzido sinteticamente, recombinantemente ou amplificação por PCR, que é capaz de hibridizar em
30 outro oligonucleotídeo de interesse. A sonda pode ser de filamento único ou de filamento duplo. Sondas são utilizáveis na detecção, identificação e isolamento de particulares seqüências de genes. Contempla-se que qualquer

sonda usada na presente invenção será rotulada como qualquer "molécula repórter" de modo que é detectável em qualquer sistema de detecção, incluindo, mas não limitado a enzima (por exemplo, ELISA, assim como testes histoquímicos com base em enzima), sistemas fluorescentes, radioativos, e
5 luminescente. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer sistema de detecção particular ou rótulo.

Como usado aqui, o termo "marcação", quando usado em referência à reação de cadeia polimerase, refere-se a região de ácido nucléico ligada pelos iniciadores usados para reação de cadeia polimerase. Assim, a
10 "marcação" é procurada para ser classificado de outras seqüências de ácido nucléico. Um "segmento" é definido como uma região de ácido nucléico dentro de uma seqüência de marcação.

Como usado aqui, o termo "reação de cadeia polimerase" ("PCR") refere-se a um método bem-conhecido na técnica (Ver por exemplo, Patente U.S. Nºs 4.683.195 4.683.202, e 4.965.188, incorporadas aqui por
15 referência), para aumentar a concentração de um segmento de uma seqüência de marcação em uma mistura de DNA genômico sem clonagem ou purificação. Este processo para amplificar a seqüência de marcação consiste em introdução de um grande excesso de dois iniciadores de oligonucleotídeos para a mistura de DNA contendo a seqüência de marcação desejada,
20 seguido por uma seqüência precisa de ciclos térmicos na presença de uma DNA polimerase. Os dois iniciadores são complementares a seus respectivos filamentos da seqüência de marcação de filamento duplo. Para efetuar a amplificação, a mistura é desnaturada e os iniciadores então anelados em suas seqüências complementares dentro da molécula de marcação. Após o
25 anelamento, os iniciadores são estendidos com uma polimerase de modo a formar um novo par de filamentos complementares. As etapas de desnaturação, anelamento e iniciador e extensão polimerase podem ser repetidas muitas vezes (isto é, desnaturação, anelamento e extensão constituem um "ciclo"; podem ser numerosos "ciclos") para obter uma elevada concentração
30 de um segmento amplificado da desejada seqüência de marcação. O comprimento do segmento amplificado da desejada seqüência de marcação é

determinado pelas posições relativas dos iniciadores um com relação a cada outro, e assim, este comprimento é um parâmetro controlável. Devido ao aspecto de repetição do processo, o método é referido como a "reação de cadeia polimerase" (aqui depois "PCR"). Porque os desejados segmentos
5 amplificados da seqüência de marcação se tornam as seqüências predominantes (em termos de concentração) na mistura, eles são ditos como sendo "amplificados por PCR".

Como usado aqui, os termos "produto PCR", "fragmento PCR" e "produto de amplificação" referem-se à mistura resultante de compostos a-
10 pós dois ou mais ciclos das etapas PCR de desnaturação, anelamento e extensão estarem completos. Estes termos englobam o caso onde se tem a amplificação de um ou mais segmentos de uma ou mais seqüências de marcação.

Como usado aqui, o termo "reagentes de amplificação" refere-se aos reagentes (trifosfatos de desoxirribonucleotídeo, tampão, etc.), necessá-
15 rios para a amplificação exceto pelos iniciadores, gabarito de ácido nucléico e a enzima de amplificação. Tipicamente, reagentes de amplificação junto com outros componentes de reação são colocados e contidos em um vaso de reação (tubo de teste, microcavidade, etc.).

20 Como usado aqui, o termo "RT-PCR" refere-se à replicação e amplificação de seqüências de RNA. Nestes método, transcrição reversa é copulada a PCR, com maior freqüência usando o procedimento de uma enzima em que uma polimerase termoestável é empregada, como descrito em patente US Nº 5.322.770, aqui incorporada por referência. Em RT-PCR, o
25 gabarito de RNA é convertido em cDNA devido a atividade de transcriptase reversa da polimerase, e então amplificado usando a atividade de polimerização da polimerase (isto é, como em outros métodos PCR).

Como usado aqui, o termo "hibridização" refere-se ao processo pelo qual um filamento de ácido nucléico se une com um filamento comple-
30 mentar através de formação de pares de bases, como conhecido na técnica.

Como usado aqui, "estringência máxima" refere-se ao nível de hibridização que tipicamente ocorre a cerca de $T_m - 5^{\circ}\text{C}$ (5°C abaixo do T_m

da sonda); "estringência elevada" a cerca de 5°C a 10°C abaixo T_m; "estringência intermediária" a cerca de 10°C a 20°C abaixo T_m; e "estringência baixa" a cerca de 20°C a 25°C abaixo T_m. Como será entendido pelos versados na técnica, uma hibridização de estringência máxima pode ser usada para identificar ou detectar seqüências polinucleotídicas enquanto uma hibridização estringência intermediária ou baixa pode ser usada para identificar ou detectar homólogos de seqüência polinucleotídica.

As frases "substancialmente similar" e "substancialmente idêntico" nos contextos de dois ácidos nucléicos ou polipeptídeos tipicamente significam que um polinucleotídeo ou polipeptídeo compreende uma seqüência que tem pelo menos 75% seqüência de identidade, preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90%, ainda mais preferivelmente 95%, o mais preferivelmente 97%, às vezes tanto como 98% e 99% de identidade seqüência, comparado com a seqüência de referência (isto é, tipo selvagem). Identidade de seqüência pode ser determinada usando programas conhecidos como BLAST, ALIGN, e CLUSTAL usando parâmetros padrão. (Ver por exemplo, Altschul, *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]; Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 [1989]; Karin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873 [1993]; e Higgins *et al.*, Gene 73:237 - 244 [1988]). Software para realizar as análises BLAST é publicamente disponível no National Center for Biotechnology Information. Também, bases de dados podem ser pesquisadas usando FASTA (Pearson *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448 [1988]).

Como usado aqui, "resíduos equivalentes" referem-se a proteínas que compartilham resíduos de aminoácidos particulares. Por exemplo, resíduos equivalentes podem ser identificados por determinação da homologia a um nível de estrutura terciária para uma proteína (por exemplo, VEGF) cuja estrutura terciária foi determinada por cristalografia de raios-X. Os resíduos equivalentes são definidos como os para as coordenadas atômicas de dois ou mais dos átomos de cadeia principal de um resíduo particular de aminoácidos de uma proteína tendo resíduos equivalentes putativos e uma proteína de interesse (N em N, CA em CA, C em C e O em O) estão dentro

de 0,13 nm e preferivelmente 0,1 nm após alinhamento. O alinhamento é obtido após o melhor modelo ter sido orientado e posicionado para dar a sobreposição máxima de coordenadas atômicas de átomos de proteína não hidrogênio analisadas. O modelo preferido é o modelo cristalográfico dando o fator R menor para os dados experimentais de difração à maior resolução disponível, determinado usando métodos conhecidos dos versados na técnica de cristalografia e caracterização de proteína /análise.

Em algumas modalidades, modificação é preferivelmente feita na "seqüência de DNA precursor" que codifica uma seqüência de aminoácidos da enzima precursora, mas pode ser pela manipulação da proteína precursora. No caso de resíduos que não são conservados, a substituição de um ou mais aminoácidos é limitada a substituições que produzem uma variante que tem uma seqüência de aminoácidos que não corresponde a uma encontrada em natureza. No caso de resíduos conservados, estas substituições não devem resultar em uma seqüência ocorrendo naturalmente. Derivados providos pela presente invenção ainda incluem modificação(s) química(s) que mudam as características da proteína.

Em algumas modalidades preferidas, um gene de proteína é ligado em um plasmídeo de expressão apropriado. O gene de proteína clonado é então usado para transformar ou transfectar uma célula hospedeira a fim de expressar o gene de proteína. Em algumas modalidades, este plasmídeo replica nos hospedeiros, no sentido de que ele contém os elementos bem-conhecidos necessários para a replicação de plasmídeo ou o plasmídeo pode ser projetado para integrar no cromossomo hospedeiro. Os elementos necessários são providos para expressão de genes efetiva (por exemplo, um promotor ligado operativamente ao gene de interesse). Em algumas modalidades, estes elementos necessários são supridos como o próprio promotor homólogo do gene, se ele for reconhecido (isto é, transcrito, pelo hospedeiro), um terminador de transcrição (uma região de poliadenilação para células hospedeiras eucarióticas) que é exógena ou é suprida pela região de terminador endógena do gene de proteína. Em algumas modalidades, um gene de seleção como um gene de resistência a antibiótico que

permite a manutenção cultural contínua de células hospedeiras infectadas com plasmídeo - por crescimento em meios contendo antimicrobianos é também incluído.

5 Como usado aqui, os termos "endonucleases de restrição" e "enzimas de restrição" referem-se a enzimas bacterianas, sendo que cada corta o DNA de filamento duplo em ou próximo de uma seqüência nucleotídica específica.

10 Como usado aqui, o termo "molécula de DNA recombinante" como usado aqui refere-se a uma molécula de DNA que é composta de segmentos de DNA unidos juntos por meio de técnicas biológicas moleculares.

O termo "proteína recombinante" ou "polipeptídeo recombinante" como usado aqui refere-se a uma molécula de proteína que é expressada de uma molécula de DNA recombinante.

15 O termo "proteína nativa" como usado aqui para indicar que a proteína não contém resíduos de aminoácidos codificados por seqüências de vetor; isto é, a proteína nativa contém somente os aminoácidos encontrados em uma proteína, como ela ocorre na natureza. Uma proteína nativa pode ser produzida por meios recombinantes ou pode ser isolada de uma fonte ocorrendo naturalmente.

20 Como usado aqui o termo "porção" quando em referência a uma proteína (como em "uma porção de uma dada proteína") refere-se a fragmentos desta proteína. Os fragmentos podem estar na faixa de tamanho de quatro resíduos de aminoácidos para a seqüência completa de aminoácidos menos um aminoácido.

25 Como usado aqui, o termo "proteína de fusão" refere-se a uma proteína quimérica contendo uma proteína de interesse (isto é, VEGF e seus fragmentos) unidos a um fragmento de proteína exógeno (o parceiro de fusão que consiste em uma proteína VEGF). Em algumas modalidades, o parceiro de fusão melhora a solubilidade da proteína VEGF como expressados em uma célula hospedeira, podendo prover uma etiqueta de afinidade para
30 permitir a purificação da proteína de fusão recombinante da célula hospedeira ou sobrenadante de cultura, ou ambos. Se desejado, a proteína de fusão

pode ser removida de uma proteína de interesse (isto é, VEGF e/ou seus fragmentos) por uma variedade de meios enzimáticos ou químicos conhecidos na técnica.

Os termos "em combinação operável", "em ordem operável" e "ligado operativamente" como usado aqui referem-se à ligação de seqüências de ácido nucléico em tal modo que as moléculas de ácido nucléico capazes de dirigir a transcrição de um dado gene e/ou a síntese de uma molécula de proteína desejada são produzidas. O termo também refere-se a ligação de seqüências de aminoácidos em tal modo que uma proteína funcional é produzida.

Como usado aqui o termo "região de codificação" quando usado em referência a um gene estrutural refere-se a seqüências nucleotídicas que codificam os aminoácidos encontrados nos polipeptídeos nascentes como um resultado de tradução de uma molécula de mRNA. A região de codificação é ligada, em eucariotes, no lado 5' pelo tripleto de nucleotídeo "ATG" que codifica o iniciador metionina e no lado 3' por um dos três tripletos que especificam os códons de parada (isto é, TAA, TAG, TGA).

Como usado aqui, o termo "gene estrutural" refere-se a uma seqüência de DNA codificando para RNA ou uma proteína. Em contraste, "genes regulatórios" são genes estruturais que codificam produtos que controlam a expressão de outros genes (por exemplo, fatores de transcrição).

Como usado aqui, o termo "purificado" ou "para purificar" refere-se a remoção de contaminantes de uma amostra. Por exemplo, polipeptídeos aVEGF ou VEGF recombinante são expressados em células hospedeiras e os polipeptídeos são purificados pela remoção de proteínas de célula hospedeira; a porcentagem de polipeptídeos aVEGF ou VEGF recombinante é assim aumentada nas amostras.

Como usado aqui, o termo "substancialmente puro" quando aplicado a proteínas ou seus fragmentos da presente invenção significa que as proteínas são essencialmente isentas de outras substâncias em uma extensão prática e apropriada para seus usos pretendidos. Em particular, as proteínas são suficientemente puras e são suficientemente isentas de outros

constituintes biológicos das células hospedeiras de modo a serem utilizáveis em, por exemplo, seqüenciamento de proteínas, e/ou produção de preparações farmacêuticas.

5 Como usado aqui, o termo "proteína de marcação" refere-se a uma proteína (por exemplo, enzima, hormônio, etc.), cuja ação seria bloqueada por uma ligação dos inibidores variantes providos aqui.

10 Como usado aqui, os termos "seqüência variante" e "seqüências variantes" referem-se à(s) seqüência(s) de polipeptídeo curta(s) que substituem os laços de ligação do inibidor de protease tipo selvagem. A seqüência variante não precisa ter o mesmo comprimento como a seqüência do laço de ligação que ela está substituindo no inibidor de protease tipo selvagem.

15 O termo "isolado" quando usado em relação a um ácido nucléico, como em "oligonucleotídeo isolado" ou "polinucleotídeo isolado" refere-se a uma seqüência de ácido nucléico que é identificada e separada de pelo menos um ácido nucléico contaminante com o qual ela está comumente associada em sua fonte natural. O ácido nucléico isolado está presente em uma tal forma ou configuração que é diferente da em que ele é encontrado na natureza. Em contraste, ácidos nucléicos não isolados como ácidos nucléicos como DNA e RNA encontrados nos estados em que eles existem na natureza. Por exemplo, uma dada seqüência de DNA (por exemplo, um gene) é encontrada no cromossomo da célula hospedeira em proximidade aos genes vizinhos; as seqüências de RNA, como uma seqüência de mRNA específica codificando uma proteína específica, são encontradas na célula como uma mistura com numerosos outros mRNAs que codificam uma multitude de proteínas. No entanto, ácido nucléico isolado codificando uma proteína VEGF inclui, a título de exemplo, este ácido nucléico em células comumente expressando uma proteína VEGF onde o ácido nucléico está em um local cromossômico diferente do das células naturais ou é de outra forma flanqueado por uma seqüência diferente de ácido nucléico do que a encontrada na natureza. O ácido nucléico, oligonucleotídeo, ou polinucleotídeo isolado pode estar presente em forma de filamento único ou de filamento duplo. Quando um ácido nucléico, oligonucleotídeo ou polinucleotídeo isolado deve ser

20

25

30

utilizado para expressar uma proteína, o oligonucleotídeo ou polinucleotídeo irá conter, em um mínimo, o filamento sentido ou codificando (isto é, o oligonucleotídeo ou polinucleotídeo pode ser de filamento único), mas pode conter tanto os filamentos sentido como anti-sentido (isto é, o oligonucleotídeo ou polinucleotídeo pode ser de filamento duplo).

5

Como usado aqui, uma "composição compreendendo uma dada seqüência polinucleotídica" refere-se amplamente a qualquer composição contendo a dada seqüência polinucleotídica. Composição pode estar em qualquer forma, particularmente uma forma que é apropriada para administração.

10

Como usado aqui, um composto é dito como estando "em uma forma apropriada para administração" quando o composto pode ser administrado a um ser humano ou outro animal por qualquer via desejada (por exemplo, tópica, oral, etc.).

15

Como usado aqui, "quantidade efetiva e segura" refere-se a uma quantidade suficiente de um material que significativamente induz uma modificação positiva para a área sobre a qual o material é aplicado e também não resulta na produção de sérios efeitos laterais (em uma relação risco/benefício razoável). A quantidade efetiva e segura do material pode variar com a pele particular ou outra parte do corpo sendo tratada, a idade do indivíduo sendo tratado, a severidade da condição sendo tratada, a duração de tratamento, a natureza de terapia concorrente, o material específica usado, o veículo particular utilizado, etc. Os versados na técnica são capazes de ajustar a concentração das composições de cuidado pessoal providas aqui para a aplicação desejada das composições.

20

25

Como usado aqui, o termo "composição de cuidado pessoal" refere-se a um produto para aplicação à pele, cabelo, unhas, cavidade oral e membranas relacionadas para o fim de melhorar, limpar, embelezar, tratar, e/ou cuidar destas superfícies e membranas.

30

Em algumas modalidades, a composição de cuidado pessoal está na forma de um veículo emulsificado, como um creme ou loção nutriente, um gel estabilizado ou sistema dispersante, como amaciante da pele,

uma emulsão nutriente, um creme nutriente, um creme de massagem, um soro de tratamento, um sistema de distribuição lipossomal, uma máscara ou porção tópica facial, um sistema de limpeza à base de tensoativos como um xampu ou líquido de limpeza corporal, uma dispersão ou emulsão aerossolizada ou pulverizada, um condicionador da pele ou cabelo, auxiliar de penteado, ou um produto pigmentado como maquiagem em forma líquida, creme, sólida, anidra ou lápis. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer forma particular, como várias formas encontram uso na presente invenção.

10 Produtos de cuidado pessoal pode ser classificados/descritos como compostos cosméticos, de venda direta ("OTC") que encontram uso em aplicações de cuidado pessoal (por exemplo, cosméticos, cuidado da pele, cuidado oral, cuidado do cabelo, cuidado das unhas). Em algumas modalidades, o polímero de proteína de seqüência de repetição é adicionado a
15 uma composição de cuidado pessoal como a composição de cuidado do cabelo, a composição de cuidado da pele, a composição de cuidado das unhas, a composição cosmética, ou qualquer uma de suas combinações.

 Como usado aqui, "composição cosmética" refere-se a composições que encontram uso nos cosméticos. A definição do The Food Drug and
20 Cosmetic Act (FD&C Act) é usada aqui. Assim, cosméticos são definidos por seus usos pretendidos, como artigos destinados a serem esfregados, despejados, aspergidos ou pulverizados sobre, introduzidos em ou de outra forma aplicados ao corpo humano para limpeza, embelezamento, promoção da atratividade ou alteração da aparência. Estas composições proporcionam
25 benefícios não terapêuticos e não são reguladas como fármacos. No entanto, em algumas situações, as composições cosméticas são incorporadas em composições farmacêuticas para prover benefícios cosméticos (por exemplo produtos para tratar doenças da pele ou do cabelo, mas também contém composições cosméticas por seus benefícios colorantes ou outros). Também,
30 pretende-se que a presente invenção englobe o uso de cosméticos em animais diferentes dos seres humanos.

 Como usado aqui, os termos "composições farmacêuticas" e

"composições terapêuticas" referem-se a composições como fármacos que proporcionam benefícios médicos em vez de apenas benefícios cosméticos. Nos Estados Unidos, as composições farmacêuticas e terapêuticas são aprovadas pelo Food and Drug Administration para o tratamento e/ou prevenção de condições particulares.

Como usado aqui, o termo "fármaco" é definido como tal na definição do FD&C Act. Assim, fármacos são definidos como artigos destinados para uso em diagnose, cura, mitigação, tratamento ou prevenção de doença, e artigos (diferentes de alimentos) destinados a afetar a estrutura ou qualquer função do corpo do homem ou de outros animais.

Como usado aqui, "deixar" refere-se a uma composição que é aplicada a um indivíduo e não removida (por exemplo, para limpar por lavagem, enxágüe, etc.) durante um período de tipicamente de pelo menos várias horas (por exemplo, 4-12 horas) antes da área exposta à composição ser limpa.

Como usado aqui, uma composição de "enxágüe" é uma composição que é aplicada e limpa (por exemplo, por lavagem, enxágüe, etc.) logo após sua aplicação (geralmente em cerca de 30 minutos de aplicação). Em algumas modalidades preferidas, as composições de enxágüe são formuladas de modo a depositar uma quantidade efetiva de ativo(s) sobre a área tratada.

Como usado aqui, o termo "benefício cosmético" refere-se a uma mudança cosmética desejada que resulta da administração de uma composição de cuidado pessoal. Os benefícios cosméticos incluem mas não são limitados a melhoras nas condições da pele, cabelo, unhas, e a cavidade oral. Em modalidades preferidas, pelo menos um benefício cosmético é provido pelas composições de cuidado da pele, cuidado do cabelo, cuidado das unhas, e maquiagem da presente invenção.

Como usado aqui, "cosmeticamente aceitável" refere-se a materiais que são apropriados para uso em contato com tecidos de humanos e/ou outros animais, sem indevida toxicidade, incompatibilidade, instabilidade, irritação, respostas alérgicas, etc., de acordo com uma relação benefí-

cio/risco razoável.

Como usado aqui, "composição de cuidado da pele" refere-se a composições que são aplicadas à pele a fim de prover propriedades benéficas, incluindo mas não limitadas a minimização de rugas, remoção de rugas, 5 descoloração, coloração, amaciamento da pele, suavização da pele, depilação, limpeza, etc. Em algumas modalidades particularmente preferidas, a presente invenção provê composições de cuidado da pele que melhoram tonalidade da pele. Nestas modalidades, a melhora compreende a redução de rugas, suavização da textura da pele, modificação da coloração da pele, 10 e outros desejados benefícios cosméticos. Em outras modalidades, a composição de cuidado da pele está em uma forma selecionada dentre o grupo consistindo em líquidos de limpeza corporal, líquidos umectantes de limpeza corporal, desodorante líquidos de limpeza corporal, limpadores antimicrobianos, tratamentos de proteção da pele, loções corporais, cremes faciais, cre- 15 mes umectantes, emulsões de limpeza facial, limpadores faciais à base de tensoativos, géis esfoliantes faciais, tonalizantes faciais, cremes esfoliantes, máscaras faciais, loções após-barba, bálsamos, e/ou composições radioprotetoras (por exemplo, filtros solares).

Como usado aqui, "melhorar a aparência visual da pele" refere- 20 se a qualquer benefício obtido através do uso das composições de cuidado pessoal da presente invenção. Exemplos de benefícios incluem mas não são limitados à redução da visual aparência de poros (por exemplo, redutores do tamanho dos poros), redutores imperfeições e/ou manchas na cor da pele, incluindo clarear regiões hiper pigmentadas da pele e/ou nivelar a pigmen- 25 tação da pele, aliviar a secura, eliminar pontos grossos, secos, melhorar a capacidade da pele de reter umidade e/ou se proteger dos estresses ambientais, reduzir a aparência de linhas e rugas finas melhorar aparência e tonalidade da pele, aumentar a firmeza e a elasticidade da pele, diminuir a perda de firmeza da pele, aumentar o brilho e clareza da pele, aumentar o proces- 30 so de renovação da pele, e/ou remover o cabelo veloso. Melhorar a aparência visual da pele também engloba a regulação das rugas, atrofia, clareamento da pele, escurecimento da pele, suavidade da pele, e/ou redução da

aparência visual de poros.

Como usado aqui, "modificar a tonalidade da pele" refere-se a uma mudança na cor da pele, escurecimento ou clareamento da cor da pele. No entanto, em outros contextos, o termo é também usado em referência a
 5 modificações na saúde do tecido muscular e conectivo da pele (isto é, não está relacionado com a cor da pele, mas com a firmeza da pele).

Como usado aqui, "clareamento da tonalidade da pele" e "clareamento da pele" referem-se uma diminuição na escuridade da pele visualizada por olho e/ou meios mecânicos. Pretende-se que o termo englobe
 10 qualquer faixa de clareamento observável (isto é, "branqueamento") da tonalidade da pele. Em algumas modalidades, o termo engloba diminuir a concentração de melanina presente na pele, incluindo as áreas da pele com hiperpigmentação devido a presença de sinais de idade, melasma, cloasma, sardas, hiperpigmentação pós-inflamatório, e/ou hiperpigmentação induzida
 15 pela pele.

Como usado aqui, "região hiperpigmentada" refere-se a uma região localizada de pele mais escura com relação à tonalidade base da pele de um indivíduo particular. Por exemplo, em modalidades preferidas, regiões hiperpigmentadas são áreas com aumentos localizados em melanina.

20 Como usado aqui, "prevenir escurecimento da pele", "prevenir escurecimento da tonalidade da pele", "evitar o escurecimento da tonalidade da pele", "evitar o desenvolvimento da cor da pele", e outras frases equivalentes referem-se a tonalidade da pele que é observada como uma pele de menor pigmentação ou escuridade comparada a uma pele não tratada após
 25 radiação UV e/ou exposição solar. Assim, em algumas modalidades particularmente preferidas, as composições da presente invenção provêem um benefício por prevenir os efeitos do escurecimento da pele associados com exposição solar e/ou Radiação UV. Pretende-se que o termo englobe qualquer faixa de diferença observável entre pele exposta ao sol que é protegida
 30 do escurecimento e pele exposta ao sol que não é protegida.

Como usado aqui, "nivelar a tonalidade da pele" refere-se a nivelar a cor da pele em uma área de aplicação. Em modalidades preferidas, a

frase refere-se ao uso de composições da presente invenção para tornar a cor da pele igual ou prover um menor contraste na cor da pele em uma ou mais regiões da pele.

- Como usado aqui, "reduzir a vermelhidão na tonalidade da pele" refere-se a uma diminuição da cor vermelha da pele, como observado visualmente ou por outros meios.

- Como usado aqui, "inibir o crescimento de cabelo" e "inibição do crescimento de cabelo" referem-se a uma diminuição observada do comprimento e/ou espessura do cabelo. Assim, em algumas modalidades preferidas, aplicação de uma composição de cuidado pessoal da presente invenção provê um benefício em diminuir o comprimento e/ou espessura do cabelo, como comparado a uma área em que a composição de cuidado pessoal da presente invenção não foi aplicada. Em algumas modalidades, a redução observada do crescimento de cabelo e/ou espessura está em uma faixa de menos do que 1% a mais do que 99%, como comparado a áreas não tratadas, enquanto em outras modalidades, a redução observada é de cerca de 100% a cerca de 90%, de cerca de 90% a cerca de 80%, de cerca de 80% a cerca de 70%, de cerca de 70% a cerca de 60%, de cerca de 60% a cerca de 50%, de cerca de 50% a cerca de 40%, de cerca de 40% a cerca de 30%, de cerca de 30% a cerca de 20%, de cerca de 20% a cerca de 10%, de cerca de 10% a cerca de 1%. De fato, não se pretende que o termo seja limitado a qualquer redução percentual particular, desde que a redução seja observável por meios visuais (isto é a olho nu) ou outros meios. Pretende-se também que o termo englobe "evitar o crescimento de cabelo" a qualquer grau, como descrito acima. Não se pretende que o termo seja limitado a completa prevenção de crescimento de cabelo (isto é, não se observa crescimento de cabelo).

- Como usado aqui, "composição de cuidado do cabelo" refere-se a composições que são aplicadas ao cabelo para prover propriedades benéficas como espessamento, afinamento, coloração, descoloração, limpeza, condicionamento, amaciamento, modelagem, etc. Em algumas modalidades, a composição de cuidado do cabelo está em uma forma selecionada dentre

o grupo consistindo em xampus, condicionadores, tratamentos anticaspa, auxiliar de penteados, condicionadores do penteado, reparo do cabelo ou soros de tratamento, loções, cremes, pomadas, e tratamentos químicos. Em outras modalidades, os auxiliares de penteado são selecionados dentre o grupo consistindo em pulverizações, espumas, enxágües, géis, espumas, e suas combinações. Em outras modalidades, o química tratamentos são selecionado dentre o grupo consistindo em ondas permanentes, relaxadores de ondas, e permanentes, semipermanentes, tratamentos temporários de cor e suas combinações.

10 Como usado aqui, "composições de maquiagem" referem-se a preparações cosméticas que são usados para embelezar, cuidar, manter, ou aumentar a aparência de um ser humano ou outro animal. "Composições de maquiagem" incluem, mas não são limitados a cosméticos coloridos, como rímel, batons, lápis para os lábios, sombras para os olhos, lápis para os o-

15 lhos, rouges, pós faciais, bases, *blushes*, e esmalte de unhas. Em algumas modalidades, a composição cosmética da presente invenção está em uma forma selecionada dentre o grupo consistindo em géis para os olhos, sombras para os olhos, batons de ponto de derretimento elevado, batons, brilhos para os lábios, bálsamos para os lábios, rímel, lápis de sobrancelhas, lápis

20 para os olhos, formulações de pó compacto, bases, pigmentos revestidos com proteínas, e suas combinações. Em outras modalidades, as composições cosméticas compreendem composições de maquiagem. Em ainda outra modalidade, a composição de cuidado das unhas está em uma forma selecionada dentre o grupo consistindo em esmalte de unhas, tratamento de

25 cutículas, esmalte brilhante de unhas, tratamento de unhas, e removedor de esmalte brilhante.

 Como usado aqui, "composições de cuidado oral" referem-se a composições de cuidado pessoal apropriados para uso na boca, incluindo mas não limitadas a formas selecionadas dentre o grupo consistindo em

30 pastas de dentes, géis de dentes, colutórios, refrescantes bucais, tratamentos de branqueamento, e substratos de veículos inertes.

 Como usado aqui, o termo "fase dispersa" é usado pelos versa-

dos na técnica de tecnologia de emulsão como a fase que existe como partículas pequenas ou gotículas em suspensão em e circundadas por uma fase contínua. A fase dispersa é também conhecida como a fase "interna" ou "descontínua".

5 Como usado aqui, "melhoradores de penetração" referem-se a composições que facilitam a penetração através da barreira do estrato córneo superior para as camadas mais profundas da pele. Exemplos de melhoradores da penetração incluem, mas não são limitados a, propileno glicol, azônio, etoxidiglicol, dimetil isosorbídeo, uréia, etanol, dimetil sulfóxido, mi-
10 croemulsões, lipossomas, e nanoemulsões.

 Como usado aqui, os termos "emulsificante" e "tensoativo" referem-se a compostos que dispersam e colocam em suspensão a fase dispersa dentro da fase contínua de um material. Tensoativos encontram uso particular em produtos destinados para limpeza da pele e/ou cabelo. Em formas
15 particulares de realização, o termo "tensoativo(s)" é usado em referência a agentes tensoativos, ou usados como emulsificantes ou para outros fins tensoativos como limpeza da pele.

 Em várias modalidades, a presente invenção também inclui "agentes protetores" como absorvedores de UV (por exemplo, metoxicinamato
20 de octila, benzofenona-3, dióxido de titânio, e salicilato de octila); agentes formadores de películas (por exemplo, copolímero VP/Eicoseno); agentes cosmeceúticos (por exemplo, peptídeos e proteínas, ácidos alfa hidróxi, e derivados de retinol e ácido retinóico); antioxidantes (por exemplo, tocoferol e seus derivados e ácido ascórbico e seus derivados); vitaminas (por exem-
25 plo, B, D, K e seus derivados); antiperspirante ativos (por exemplo, hidróxido de alumínio e hidróxido de zircônio); agentes depilantes (por exemplo, sais tioglicolato); agentes antiacne (por exemplo, ácido salicílico e peróxido de benzoíla); abrasivos e esfoliantes (por exemplo, silicatos, pedra-pome, e polietileno); e extratos de plantas, frutas, vegetais e/ou fontes marinhas.

30 Assim, em algumas modalidades, a presente invenção provê composições compreendendo qualquer filtro UV-A e UV-B orgânico, por exemplo mas não limitados aos seguintes:

Nr.	Composto	CAS-Nr. (=ácido)
1	4-Ácido aminobenzóico	150-13-0
2	3-(4'-trimetilamônio)-benzilidenbornan-2-on-metilsulfato	52793-97-2
3	3,3,5-Trimetil-ciclohexil-salicilato (Homossalato)	118-56-9
4	2-hidróxi-4-metóxi-benzofenona (Oxibenzônio)	131-57-7
5	ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfônico e seus sais de cálcio, sódio, e trietanolamina	27503-81-7
6	ácido 3,3'-(1,4-Fenilendimetin)-bis(7,7-dimetil-2-oxobiciclo[2.2.1]heptan-1-metanossulfônico) e seus sais	90457-82-2
7	éster etílico de ácido 4-Bis(polietóxi)amino-benzopolietóxi	113010-52-9
8	éster etil hexílico de ácido 2-4-dimetilamino-benzóico	21245-02-3
9	éster etil hexílico de ácido 2-salicílico	118-60-5
10	éster isoamílico de ácido 4-Metóxi-2-cinâmico	71617-10-2
11	éster etil hexílico de ácido 4-Metóxi-2-cinâmico	5466-77-3
12	ácido 2-hidróxi-4-metóxi-benzofenon-5-sulfônico- (sulisobenzônio) e o sal de sódio	4065-45-6
13	3-(4'-Sulfobenziliden)-bornan-2-ona e seus sais	58030-58-6
14	3-Benzilidenbornan-2-ona	16087-24-8
15	1-(4'-Isopropilfenil)-3-fenilpropan-1,3-diona	63260-25-9
16	salicilato de 4-isopropilbenzila	94134-93-7
17	ácido 3-Imidazol-4-il-acrílico e seu éster etílico	104-98-3
18	éster etílico de ácido 2-Ciano-3,3-difenil acrílico	5232-99-5
19	éster etil hexílico de ácido 2-ciano-3,3-difenil -2'-acrílico	6197-30-4
20	Mentil-o-aminobenzoato: 5-Metil-2-(1-metiletil)-2-aminobenzoato	134-09-8
21	Gliceril p-aminobenzoato: éster de -1-glicerila de ácido 4-aminobenzóico	136-44-7
22	2,2'-dihidróxi-4-metoxibenzofenona (Dioxibenzona)	131-53-3
23	2-hidróxi-4-metóxi-4-metilbenzofenona	1641-17-4

Nr.	Composto	CAS-Nr. (=ácido)
	(Mexenona)	
24	Salicilato de trietanolamina	2174-16-5
25	Ácido de dimetoxifenilgloxal: ácido 3,4-dimetóxi-fenil-gloxal-sódio	4732-70-1
26	3-(4'Sulfobenziliden)-bornan-2-ona e seus sais	56039-58-8
27	4-terc-butil-4'-metóxi-dibenzoilmetano	70356-09-1
28	2,2',4,4'-tetrahidroxibenzofenona	131-55-5
29	2,2'-Metileno-bis-[6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3,- tetrametilbutil)fenol]	103597-45-1
30	ácido 2,2'-(1,4-Fenilen)-bis-1H-benzimidazol-4,6- dissulfônico, sal de sódio	180898-37-7
31	2,4-bis-[4-(2-Etilhexilóxi)-2-hidróxi]fenil- 6-(4-metoxifenil)-(1,3,5)-triazina	187393-00-6
32	3-(4-Metilbenziliden)-cânfora	36861-47-9
33	éster etílico de ácido 4-bis(polietóxi) polietóxi para amino- benzóico	113010-52-9
34	2,4-Dihidroxibenzofenona	131-56-6
35	sulfonato 2,2'-Dihidróxi-4,4'-dimetoxibenzofenona-5,5'- dissódico	3121-60-6
36	éster hexílico de ácido, 2-[4-(dietilamino)-2-hidroxibenzoil] benzóico,	302776-68-7
37	2-(2H-Benzotriazol-2-il)-4-metil-6-[2-metil-3-[1,3,3,3- tetrametil-1-[(trimetilsilil)óxi]disiloxanil]propil]fenol	155633-54-8
38	1,1-[(2,2'-Dimetilpropóxi)carbonil]-4,4-difenil-1,3-butadieno	363602-15-7

Em algumas modalidades, a presente invenção provê composições compreendendo pigmentos, incluindo, mas não limitados a pigmentos inorgânicos com base em óxidos de metal e/ou outros compostos levemente solúveis em água ou compostos de metal insolúveis como óxidos de zinco (ZnO), titânio (TiO₂), ferro (por exemplo, Fe₂O₃), zircônio (ZrO₂), sílica (SiO₂), manganês (por exemplo, MnO), alumínio (Al₂O₃), óxido de cério (por exem-

plo, Ce_2O_3), e composições mistas destes óxidos, assim como suas misturas. Em algumas modalidades preferidas, os óxidos de metal são microfinos, enquanto em modalidades preferidas alternativas, os óxidos de metal são de tipo pigmento. Em outras modalidades adicionais, os pigmentos são "revestidos" de modo que eles são tratados na superfície. Em algumas modalidades preferidas, o revestimento compreende uma camada de película fina, hidrofóbica, enquanto em outras modalidades, o revestimento compreende uma camada de película fina, hidrofílica.

Como usado aqui, os termos "pigmento", "pigmento colorido" e "corante" usados em referência às composições da presente invenção englobam qualquer composto que proporciona uma cor à composição e/ou confere uma cor à superfície (por exemplo, pele e/ou cabelo) na composição em que é aplicado. Em algumas modalidades, os corantes e pigmentos são selecionados da lista de colorantes cosméticos provida pelo Cosmetic Directive ou EC. Na maior parte dos casos, estes corantes e pigmentos são idênticos aos corantes aprovados para alimentos. Pigmentos/corantes preferidos incluem por exemplo, dióxido de titânio, mica, óxidos de ferro (por exemplo, Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , $\text{FeO}(\text{OH})$) e/ou óxido de estanho. Pigmentos /corantes vantajosos incluem por exemplo, carmine, azul Berlin, óxido de cromo verde, azul ultramarinho e/ou violeta manganês. Em algumas modalidades preferidas, os pigmentos/corantes incluem, mas não são limitados aos na seguinte tabela. Números do Colour Index (CIN) são conhecidos na técnica (vide, Society of Dyers and Colourists, Rowe Colour Index, 3a. ed. Bradford, England, [1971]).

NOME QUÍMICO OU SIMILAR	CIN	COR
Pigmento Verde	10006	verde
Ácido Verde 1	10020	verde
Ácido 2,4-Dinitrohidroxinaftaleno-7-sulfônico 21755-110	10316	amarelo
Pigmento Amarelo 1	11680	amarelo
Pigmento Amarelo 3	11710	amarelo
Pigmento Laranja 1	11725	laranja

NOME QUÍMICO OU SIMILAR	CIN	COR
2,4-Dihidroxiazobenzeno	11920	laranja
Solvente Vermelho 3	12010	vermelho
1-(2'-cloro-4'-nitro-1'-fenilazo)-2-hidroxinaftaleno	12085	vermelho
Pigmento Vermelho 3	12120	vermelho
Vermelho Ceres; vermelho Sudan; vermelho Fat G	12150	vermelho
Pigmento Vermelho 112	12370	vermelho
Pigmento Vermelho 7	12420	vermelho
Pigmento Marrom 1	12480	marrom
4-(2'-Metóxi-5'-sulfodietilamido-1'-fenilazo)-3-hidróxi-5'-cloro-2",4"-dimetóxi-2-naftanilida	12490	vermelho
Amarelo 16 disperso	12700	amarelo
ácido 1-(4-Sulfo-1-fenilazo)-4-aminobenzeno -5-sulfônico	13015	amarelo
ácido 2,4-dihidroxiazobenzeno -4'-sulfônico	14270	laranja
ácido 2-(2,4-Dimetilfenilazo-5-sulfo)-1-hidroxinaftaleno-4-sulfônico	14700	vermelho
ácido 2-(4-Sulfo-1-naftilazo)-1-naftol-4-sulfônico	14720	vermelho
ácido 2-(6-Sulfo-2,4-xililazo)-1-naftol-5-sulfônico	14815	vermelho
1-(4'-Sulfofenilazo)-2-hidroxinaftaleno	15510	laranja
1-(2-Sulfo-4-cloro-5-carbóxi-1-fenilazo)-2-hidroxinaftaleno	15525	vermelho
1-(3-Metilfenilazo-4-sulfo)-2-hidroxinaftaleno	15580	vermelho
1-(4',(8')-Sulfonaftilazo)-2-hidroxinaftaleno	15620	vermelho
ácido 2-Hidróxi-1,2'-azonaftaleno-1'-sulfônico	15630	vermelho
ácido 3-Hidróxi-4-fenilazo-2-naftilcarboxílico	15800	vermelho
ácido 1-(2-Sulfo-4-metil-1-fenilazo)-2-naftil- carboxílico	15850	vermelho
ácido 1-(2-Sulfo-4-metil-5-cloro-1-fenilazo)-2-hidroxinaftaleno-3-carboxílico	15865	vermelho
ácido 1-(2-Sulfo-1-naftilazo)-2-hidroxinaftaleno-3-carboxílico	15880	vermelho
ácido 1-(3-Sulfo-1-fenilazo)-2-naftol-6-sulfônico	15980	laranja
ácido 1-(4-Sulfo-1-fenilazo)-2-naftol-6-sulfônico	15985	amarelo
Vermelho Allura	16035	vermelho
ácido 1-(4-Sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-3,6-dissulfônico	16185	vermelho

NOME QUÍMICO OU SIMILAR	CIN	COR
Laranja Ácido 10	16230	laranja
Ácido 1-(4-Sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-6,8-dissulfônico	16255	vermelho
Ácido 1-(4-Sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-3,6,8-trissulfônico	16290	vermelho
Ácido 8-Amino-2-fenilazo-1-naftol-3,6-dissulfônico	17200	vermelho
Vermelho Ácido 1	18050	vermelho
Vermelho Ácido 155	18130	vermelho
Amarelo Ácido 121	18690	amarelo
Vermelho Ácido 180	18736	vermelho
Amarelo Ácido 11	18820	amarelo
Amarelo Ácido 17	18965	amarelo
Ácido 4-(4-Sulfo-1-fenilazo)-1-(4-sulfofenil)-5-hidróxi-pirazo- lona-3-carboxílico	19140	amarelo
Pigmento Amarelo 16	20040	amarelo
2,6-(4'-Sulfo-2", 4"-dimetil) bisfenilazo)-1,3-dihidroxibenzeno	20170	laranja
Preto Ácido 1	20470	preto
Pigmento Amarelo 13	21100	amarelo
Pigmento Amarelo 83	21108	amarelo
Solvente Amarelo	21230	amarelo
Vermelho Ácido 163	24790	vermelho
Vermelho Ácido 73	27290	vermelho
Ácido 2-[4'-(4"-Sulfo-1"-fenilazo)-7'-sulfo-1'-naftilazo]-1-hidróxi -7-aminonaftaleno-3,6-dissulfônico	27755	preto
Ácido 4'-[(4"-Sulfo-1"-fenilazo)-7'-sulfo-1'-naftilazo]-1-hidróxi -8-acetilaminonaftaleno-3,5-dissulfônico	28440	preto
Laranja direto 34, 39, 44, 46, 60	40215	laranja
Amarelo alimentício	40800	laranja
trans-β-Apo-8'-carotinaldeído (C ₃₀)	40820	laranja
Éster etílico de ácido trans-Apo-8'-carotínico (C ₃₀)	40825	laranja
Cantaxantina	40850	laranja
Azul Ácido 1	42045	azul

NOME QUÍMICO OU SIMILAR	CIN	COR
2,4-Dissulfo-5-hidróxi-4'-4"-bis(dietilamino) trifenilcarbinol	42051	azul
4-[(4-N-Etil-p-sulfobenzilamino)fenil(4-hidróxi-2-sulfofenil)(metileno)-1-(N-etil-N-p-sulfobenzil)-2,5-ciclohexadienimina]	42053	verde
Azul Ácido 7	42080	azul
(N-Etil-p-sulfobenzilamino)fenil(2-sulfofenil)metileno-(N-etil-N-p-sulfobenzil)D ^{2,5} -ciclohexadienimina	42090	azul
Verde Ácido 9	42100	verde
Dietildissulfobenzildil-4-amino-2-cloro-di-2-metil-fucsina imônio	42170	verde
Violeta básico	42510	violeta
Violeta básico 2	42520	violeta
2'-Metil-4'-(N-etil-N-m-sulfobenzil)amino-4"-(N-dietil)amino-2-metil-N-etil-N-m-sulfobenzilfucsina imônio	42735	azul
4'-(N-Dimetil)amino-4"-(N-fenil)aminonafto-N-dimetil-fucsina imônio	44045	azul
2-Hidróxi-3,6-dissulfo-4,4'-bisdimetilaminonafto-fucsina imônio	44090	verde
Vermelho Ácido 52	45100	vermelho
Sal 3-(2'-Metilfenilamino)-6-(2'-metil-4'-sulfofenilamino)-9-(2"-carboxifenil)xanteno	45190	violeta
Vermelho Ácido 50	45220	vermelho
Ácido Fenil-2-oxifluorona-2-carboxílico	45350	amarelo
4,5-Dibromofluoresceína	45370	laranja
2,4,5,7-Tetrabromofluoresceína	45380	vermelho
Corante Solvente	45396	laranja
Vermelho Ácido 98	45405	vermelho
3',4',5',6'-Tetracloro-2,4,5,7-tetrabromofluoresceína	45410	vermelho
4,5-Diodofluoresceína	45425	vermelho
2,4,5,7-Tetraiodofluoresceína	45430	vermelho
Quinoftalona	47000	amarelo
Ácido quinoftalonadissulfônico	47005	amarelo

NOME QUÍMICO OU SIMILAR	CIN	COR
Violeta Ácido 50	50325	violeta
Preto Ácido 2	50420	preto
Pigmento Violeta 23	51319	violeta
1,2-Dioxiantraquinona, complexo cálcio-alumínio	58000	vermelho
Ácido 3-Oxipireno-5,8,10-sulfônico	59040	verde
1-Hidróxi-4-N-fenilaminoantraquinona	60724	violeta
1-Hidróxi-4-(4'-metilfenilamino)antraquinona	60725	violeta
Violeta Ácido 23	60730	violeta
1,4-Di(4'-metilfenilamino)antraquinona	61565	verde
1,4-Bis(o-sulfo-p-toluidino)antraquinona	61570	verde
Azul Ácido 80	61585	azul
Azul Ácido 62	62045	azul
N,N'-Dihidro-1,2,1',2'-antraquinona azina	69800	azul
Azul de tina 6; Pigmento azul 64	69825	azul
Laranja de tina 7	71105	laranja
Indigo	73000	azul
Indigo- ácido dissulfônico	73015	azul
4,4'-Dimetil-6,6'-diclorotioindigo	73360	vermelho
5,5'-Dicloro-7,7'-dimetiltioindigo	73385	violeta
Violeta Quinacridona 19	73900	violeta
Pigmento Vermelho 122	73915	vermelho
Pigmento azul 16	74100	azul
Ftalocianina	74160	azul
Azul direto 86	74180	azul
Ftalocianinas cloradas	74260	verde
Amarelo Natural 6,19; Vermelho Natural 1	75100	amarelo
Bixina, Nor-Bixina	75120	laranja
Licopeno	75125	amarelo
trans-alfa-, beta- e gama-caroteno	75130	laranja
Derivados de ceto- e/ou hidroxila de caroteno	75135	amarelo

NOME QUÍMICO OU SIMILAR	CIN	COR
Guanina ou agente perolizante	75170	branco
1,7-Bis(4-hidróxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona	75300	amarelo
Complexo de sal (Na, Al, Ca) de ácido carmínico	75470	vermelho
Clorofila a e b; compostos de cobre de clorofilas e Clorofilainas	75810	verde
Alumínio	77000	branco
Alumina hidratada	77002	branco
Silicatos de alumínio anidros	77004	branco
Ultramarinho	77007	azul
Pigmento Vermelho 101 e 102	77015	vermelho
Sulfato de bário	77120	branco
Oxicloreto de bismuto e suas misturas com mica	77163	branco
Carbonato de cálcio	77220	branco
sulfato de cálcio	77231	branco
Carbono	77266	preto
Pigmento preto 9	77267	preto
Carbo medicinalis vegetabilis	77268	preto
óxido de cromo	77288	verde
óxido de cromo, hidroso	77289	verde
Pigmento Azul 28, Pigmento Verde 14	77346	verde
Pigmento Metal 2	77400	marrom
Ouro	77480	marrom
Óxidos e hidróxidos de ferro	77489	laranja
Óxido de ferro	77491	vermelho
Óxido de ferro, hidratado	77492	amarelo
Óxido de ferro	77499	preto
Misturas de ferro (II) e hexaciano-ferrato de ferro(III)	77510	azul
Pigmento Branco 18	77713	branco
Difosfato de manganês amônio	77742	violeta
Fosfato de manganês ; $Mn_3(PO_4)_2 \cdot 7 H_2O$	77745	vermelho
Prata	77820	branco

NOME QUÍMICO OU SIMILAR	CIN	COR
Dióxido de titânio e suas misturas com mica	77891	branco
Óxido de zinco	77947	branco
6,7-Dimetil-9-(1'-D-ribitol)-isoaloxazina, lactoflavina		amarelo
Coloração de açúcar		marrom
Capsantina, capsorrubina		laranja
Betanina		vermelho
Sais de benzopirílico, antocianos		vermelho
Estearato de alumínio, zinco, magnésio e cálcio		branco
Azul bromotimol		azul
Verde bromocresol		verde
Vermelho Ácido 195		vermelho

- Em ainda outras modalidades, composições da presente invenção ainda compreendem uma mais substâncias dentre o seguinte grupo:
- 2,4-dihidroxiazobenzeno, 1-(2'-cloro-4'-nitro-1'-fenilazo)-2-hidroxinaftaleno, Ceres Vermelho, ácido 2-(4-sulfo-1-naftilazo)-1-naftol-4-sulfônico, sal de cálcio de ácido 2-hidróxi-1,2'-azonaftaleno-1'-sulfônico, sais de cálcio e bário de ácido 1-(2-sulfo-4-metil-1-fenilazo)-2-naftilcarboxílico, sal de cálcio de ácido 1-(2-sulfo-1-naftilazo)-2-hidroxinaftaleno-3-carboxílico, sal de alumínio de ácido 1-(4-sulfo-1-fenilazo)-2-naftol-6-sulfônico, sal de alumínio de ácido 1-(4-sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-3,6-dissulfônico, ácido 1-(4-sulfo-1-naftilazo)-2-naftol-6,8-dissulfônico, sal de alumínio de ácido 4-(4-sulfo-1-fenilazo)-1-(4-sulfofenil)-5-hidroxipirazolona-3-carboxílico, sais de alumínio e zircônio de 4,5-dibromofluoresceína, sais de alumínio e zircônio de 2,4,5,7-tetrabromofluoresceína, 3',4',5',6'-tetracloro-2,4,5,7-tetrabromofluoresceína e seu sal de alumínio, sal de alumínio de 2,4,5,7-tetraiodofluoresceína, sal de alumínio de ácido quinoftalona dissulfônico, sal de alumínio de ácido indigo dissulfônico, óxido de ferro vermelho e preto (CIN: 77 491 (vermelho) e 77 499 (preto)), hidrato de óxido de ferro (CIN: 77 492), difosfato de manganês amônio e dióxido de titânio.

Em ainda outras modalidades, corantes naturais solúveis em

óleo, como, por exemplo, extratos de páprica, β -caroteno ou cochinilha encontram uso na presente invenção.

Em outras modalidades adicionais, composições de gel creme da presente invenção compreendem pigmentos perolescentes. Em algumas modalidades preferidas, várias pigmentos perolescentes encontram uso na presente invenção, incluindo mas não limitadas a "pigmentos naturais perolescentes" (por exemplo, "essência de pérolas" [cristais mistos de guanina/hipoxantina de escamas de peixes], "mãe da pérola" [conchas de moluscos trituradas]), e "pigmentos perolescentes monocristalinos" (por exemplo, oxiclreto de bismuto [BiOCl]); e "pigmentos em substratos em camadas" (por exemplo mica/ óxido de metal).

Bases para pigmentos perolescentes incluem, mas não são limitadas a pigmentos pulverulentos, dispersões de óleo de rícino de oxiclreto de bismuto e/ou dióxido de titânio, oxiclreto de bismuto e/ou dióxido de titânio em mica. O pigmento lustroso listado sob CIN 77163, por exemplo, é particularmente vantajoso.

Um grupo adicional de pigmentos perolescentes baseados em mica/ óxido de metal que encontra uso particular na presente invenção é provido abaixo.

Grupo	Revestimento/espessura da camada	Cor
Pigmentos perolescentes prata-branco	TiO ₂ : 40 – 60 nm	prata
Pigmentos de interferência	TiO ₂ : 60 – 80 nm	amarelo
	TiO ₂ : 80 – 100 nm	vermelho
	TiO ₂ : 100 – 140 nm	azul
	TiO ₂ : 120 – 160 nm	verde
Pigmentos lustrosos coloridos	Fe ₂ O ₃	bronze
	Fe ₂ O ₃	cobre
	Fe ₂ O ₃	vermelho
	Fe ₂ O ₃	vermelho-

Grupo	Revestimento/espessura da camada	Cor
Pigmentos peroléscentes prata-branco	TiO ₂ : 40 – 60 nm	prata
Pigmentos de interferência	TiO ₂ : 60 – 80 nm	amarelo
	TiO ₂ : 80 – 100 nm	vermelho
		violeta
	Fe ₂ O ₃	vermelho-verde
	Fe ₂ O ₃	preto
Pigmentos de combinação	TiO ₂ / Fe ₂ O ₃	Tons de ouro
	TiO ₂ / Cr ₂ O ₃	verde
	TiO ₂ / azul Berlin	Azul-escuro profundo
	TiO ₂ / carmine	vermelho

Em algumas modalidades preferidas, os pigmentos peroléscentes disponíveis de Merck sob os nomes comerciais Timiron, Colorona ou Dichrona encontram uso na presente invenção. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitado a pigmentos específicos listados aqui.

- 5 De fato, pigmentos peroléscentes que encontram uso na presente invenção são obteníveis de numerosas fontes. Por exemplo, outros substratos além de mica podem ser revestidos com ainda óxidos de metal, como, por exemplo, sílica e outros. Partículas de SiO₂ revestidas com, por exemplo, TiO₂ e Fe₂O₃ ("ronaesferas"), que são vendidas por Merck e são particularmente
- 10 apropriados para a redução óptica de linhas finas encontram uso na presente invenção.

- Em modalidades alternativas, o substrato (por exemplo, mica) não é incluído. Em algumas modalidades preferidas, preferência particular é dada a pigmentos peroléscentes preparados usando SiO₂. Estes pigmentos,
- 15 que também podem ter adicionalmente efeitos goniocromáticos, são disponíveis, por exemplo, sob nome comercial Sicopearl Fantastico, disponíveis de BASF.

Em modalidades adicionais, pigmentos obtidos de Engelhard / Mearl com base em borossilicato de cálcio sódio que foram revestidos com dióxido de titânio também encontram uso. Estes são disponíveis sob o nome Reflecks. Além da cor, como um resultado de seu tamanho de partícula de 40 nm a 180 nm, eles tem um efeito de brilho resplandecente.

Em ainda outras modalidades, pigmentos de efeito que são disponíveis sob o nome comercial Metasomes Standard/Glitter em várias cores (amarelo, vermelho, verde, azul) de Flora Tech encontram uso nas composições da presente invenção. As partículas de brilho estão presentes aqui nas misturas com vários auxiliares e corantes (como, por exemplo, os corantes com os números do Colour Index (CI) 19140, 77007, 77289, 77491).

Em algumas modalidades, os corantes e pigmentos estão presentes ou individualmente ou em uma mistura. Em modalidades alternativas, eles são mutuamente revestidos um com o outro, espessuras de revestimento diferentes geralmente dando lugar a diferentes efeitos coloridos. Em algumas modalidades, a quantidade total de corantes e pigmentos conferindo cor é escolhido dentre uma faixa de concentrações (por exemplo, de cerca de 0,1% em peso a cerca de 30% em peso; preferivelmente de cerca de 0,5 a cerca de 15% em peso; e o mais preferivelmente de cerca de 1,0 a cerca de 10% em peso, em cada caso com base no peso total das preparações).

Em ainda outras modalidades, a presente invenção provê métodos para a preparação das composições da presente invenção. Em algumas modalidades, estes métodos incluem combinar e aquecer os constituintes da fase óleo e/ou a fase água separadamente, e então combinar os mesmos juntos com agitação. Em algumas modalidades preferidas, as fases são homogeneizadas. Em algumas modalidades particularmente preferidas, as composições são agitadas com consumo de energia moderado a elevado, com vantagem usando uma máquina de dispersão com aro de engrenagem a um número de rotações de no máximo 10000 rpm (preferivelmente na faixa de cerca de 2500 a cerca de 7700 rpm).

Formulações cosméticas compreendendo a presente invenção

Contempla-se que a presente invenção irá encontrar uso em

numerosas composições de cuidado pessoal. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer formiato particular ou tipo de composição. A seguinte descrição proporciona composições exemplares, não limitativas, compreendendo a seguinte invenção.

- 5 Emulsões compreendem um grupo de cosméticos usuais, comumente usados. O termo "emulsão" é geralmente usado em referência a um sistema heterogêneo de dois líquidos que são imiscíveis ou miscíveis somente em uma extensão limitada um com o outro, que são geralmente referidas como "fases." Uma fase está tipicamente na forma de gotículas
- 10 (isto é, fase "dispersa", "descontínua" ou "interna"), enquanto o outro líquido forma uma fase contínua (isto é, "coerente" ou "externa"). As formas menos comuns de aplicação incluem emulsões múltiplas (isto é, as em que as gotículas da fase dispersa [ou descontínua], compreendem, por sua parte, gotículas de uma outra fase dispersa, como emulsões água /óleo /água [A/O/A]
- 15 e emulsões óleo/água/óleo [O/A/O]).

- Se a fase óleo for finamente distribuída nas fase água, então esta é uma emulsão óleo-em-água (emulsão O/A; por exemplo leite). O caráter básico de uma emulsão O/A é determinado pela água. Estas emulsões são geralmente menos gordurosas sobre a pele, são ao contrário foscas, e
- 20 absorvem mais rapidamente na pele do que as emulsões A/O (água-em-óleo).

- Os versados na técnica são familiarizados com um grande número de opções de formulação de preparações A/O estáveis para uso cosmético e/ou dermatológico, incluindo tais formulações como cremes e un-
- 25 güentos, que são espalháveis nas faixas de temperatura ambiente à temperatura da pele, assim como loções e leites, que são mais escoáveis nesta faixa de temperatura.

- A estabilidade de emulsões é dependente de sua viscosidade, em particular da viscosidade da fase externa. Uma emulsão se torna instável
- 30 quando as partículas finamente dispersas coletam juntas para formar agregados relativamente grandes, e as gotículas que estão em contato coalescem. Este processo é referido como "coalescência." Quanto mais viscosa a

fase externa da emulsão, mais lento será o processo de coalescência. Emulsões de consistência "líquida" (= escoável) são usadas em vários cosméticos (por exemplo, loções de cuidado da pele, loções de limpeza, loções para a face, loções para as mãos, etc.). Estas composições geralmente tem uma viscosidade de cerca de 2000 mPa·s a cerca de 10.000 mPa·s. A estabilidade de emulsões escoável este precisando de uma atenção particular porque mobilidade consideravelmente maior das partículas promove uma coalescência mais rápida.

Sabe-se que as emulsões líquidas típica e atualmente em uso geralmente compreendem espessantes e não são estáveis em concentrações de eletrólitos relativamente elevadas. Isto é manifestado em separação de fase das composições. No entanto, em algumas modalidades, é desejável usar alguns eletrólitos (por exemplo, filtros UV solúveis em água), a fim de ser capaz de usar as suas outras propriedades físicas, químicas ou fisiológicas. Apesar em muitos casos a escolha apropriada do sistema emulsificante pode proporcionar algum remédio em alguma extensão, outras desvantagens podem então surgir com frequência.

Por exemplo, algumas desvantagens resultam devido ao fato de que emulsificantes, como finalmente qualquer substância química, pode disparar reações alérgicas ou reações com base em supersensibilidade (isto é, hipersensibilidade) do usuário. O uso de emulsificantes cosméticos comuns é geralmente completamente sem risco, apesar de para alguns indivíduos, as composições "hipoalergênicas" serem necessárias e/ou preferidas. De fato, em alguns indivíduos particularmente sensíveis, algumas dermatoses são disparadas por exposição a alguns emulsificantes e exposição à luz solar simultânea. Assim, como conhecido do versado, em algumas composições, emulsificantes particulares são menos preferidos e/ou são evitados.

É possível preparar preparações isentas de emulsificante. Por exemplo, algumas preparações tem uma fase oleosa que contém gotículas de água dispersas (isto é, é similar a uma emulsão A/O). Estes sistemas são às vezes chamados "hidrodispersões" ou "oleodispersões", dependendo do que é a fase dispersa e o que é a fase contínua.

Para tecnologia cosmética, não é, no entanto, nem necessário nem possível prescindir de emulsificantes de modo geral, especialmente porque se tem uma escolha pequena de emulsificantes particularmente suaves. No entanto, os emulsificantes em uso corrente falta uma faixa satisfatoriamente ampla de escolhas. Assim, o espectro de aplicação de preparações cosméticas correspondentemente suaves que são toleradas pela pele é limitado.

Além dos efeitos deletérios de alguns emulsificantes, exposição a outros fatores é conhecida como prejudicando a pele e o cabelo. Por exemplo, o efeito prejudicial da porção ultravioleta de radiação solar sobre a pele é geralmente conhecida. Apesar dos raios tendo um comprimento de onda menor do que 290 nm (isto é, a região UVC) serem absorvidos pela camada de ozônio na atmosfera da terra, os raios na faixa entre 290 nm e 320 nm (isto é, região UVB), causa eritema, queimadura solar simples ou outras queimaduras de severidade variada. O máximo de atividade de eritema de luz solar é dada como a região relativamente estreita em torno de 308 nm.

Numerosos compostos são conhecidos para prover proteção contra radiação UVB prejudicial. O mais comumente, estes compostos são derivados de 3-benzilidenocânfora, de ácido 4-aminobenzóico, de ácido cinâmico, de ácido salicílico, e benzofenona, e de 2-fenil-benzimidazol.

Também é importante ter substâncias de filtro disponíveis para a faixa entre cerca de 320 nm e cerca de 400 nm, a região de UVA, porque seus raios também podem provocar dano. Durante um longo tempo, foi considerado de modo incorreto que a radiação UV-A de onda longa, tendo um comprimento de onda de entre 320 nm e 400 nm tinha somente um ação biológica negligenciável e que, conseqüentemente, os raios UV-B eram responsáveis pelo maior fotodano à pele humana. No entanto, numerosos estudos recentes têm mostrado que a radiação UV-A é bem mais prejudicial do que a radiação UV-B com relação a disparar reações fotodinâmicas, especificamente fototóxicas e mudanças crônicas na pele. Além disso, os efeitos prejudiciais de radiação UV-B pode ser ainda intensificados por exposição a radiação UV-A.

Foi demonstrado que radiação UV-A sozinha e sob condições do dia-a-dia muito normais, é suficiente para danificar as fibras de elastina e colágeno, que são de importância essencial para a estrutura e firmeza da pele, em um curto período. Isto leva a mudanças induzidas pela luz crônicas na pele, de modo que a pele "envelhece" prematuramente. A aparência clínica de pele envelhecida pela luz tipicamente inclui aumentadas linhas e rugas, e um relevo irregular com sulcos. Além disso, as áreas da pele afetadas pelo envelhecimento da pele induzido pela luz com frequência mostram pigmentação irregular. Em alguns casos, porções marrons, ceratoses, carcinomas ou melanomas malignos surgem. A pele prematuramente envelhecida como um resultado da exposição diária a UV é também caracterizada como tendo uma atividade diminuída de células Langerhans e uma inflamação crônica, leve.

Aproximadamente 90% da radiação ultravioleta que alcança a Terra consiste em raios UV-A. Apesar da quantidade de radiação UV-B alcançando a Terra variar amplamente dependendo de numerosos fatores (por exemplo, época do ano e dia e/ou grau de latitude), os níveis de radiação UV-A que alcançam a Terra permanecem relativamente constantes em uma base diária, sem levar em conta a época do ano ou fatores geográficos. Adicionalmente, a maior parte da radiação UV-A penetra na epiderme viva, enquanto cerca de 70% dos raios UV-B são retidos pela camada córnea. A proteção preventiva contra os raios UV-A, por exemplo por aplicação de substâncias de filtro de proteção à luz na forma de uma formulação cosmética ou dermatológica à pele, é assim de fundamental importância.

Em geral, o comportamento de absorção de luz das substâncias de filtro de proteção à luz é muito bem-conhecido e documentado, principalmente devido ao fato de que os países mais industrializados tem listas positivas para o uso destas substâncias, que impõe padrões muito estritos sobre a documentação que acompanha cada produto que incorpora estas substâncias. Para a concentração das substâncias nas formulações acabadas, os valores de absorbância provêm um guia, porque a interação com substâncias dentro da pele ou na própria superfície da pele com frequência apresen-

ta variáveis que podem impactar tão bem o comportamento das composições em cada indivíduo. No entanto, é geralmente difícil estimar de antemão, quão uniforme e espessamente a substância de filtro é distribuída em e sobre a camada córnea da pele.

5 Para testar o desempenho de proteção UV-A, uso é geralmente feito do método IPD (escurecimento pigmento imediato IPD 5) conhecido dos versados. Este método é similar à determinação do fator de proteção solar, e provê um método que indica quanto mais tempo a pele protegida com a composição de proteção à luz pode ser irradiada com radiação UV-A antes
10 da pigmentação que ocorre ser igual que a produzido para pele não protegida.

 Outro método de teste que foi estabelecido em toda a Europa é o Padrão Australiano AS/NZS 2604:1997. Neste método, a absorção da preparação na região UV-A é medida. A fim de atender ao padrão, a preparação
15 deve absorver pelo menos 90% da radiação UV-A na região 320-360 nm.

 É de preocupação na formulação de composições de filtro solar que a concentração de uso de substâncias de filtro de proteção à luz conhecidas que também demonstram uma ação de filtro elevada na região UV-A é com frequência limitada pelo fato de que elas são combinadas com outras
20 substâncias que estão em forma de sólidos. Assim, existem algumas dificuldades de formulação associadas com a obtenção de um fator relativamente elevado de proteção solar e desempenho de proteção a UV-A. No entanto, os versados na técnica são geralmente conscientes de meios para superar e/ou compensar estas dificuldades.

25 Como as substâncias de filtro de proteção à luz são geralmente dispendiosas e algumas substâncias de filtro de proteção à luz são adicionalmente difíceis de incorporar em preparações cosméticas e/ou dermatológicas em concentrações relativamente elevadas, algumas modalidades da presente invenção foram projetadas para prover preparações simples e de
30 custo-eficaz que, apesar de terem concentrações incomumente baixas de substâncias de filtro de proteção à luz UV-A convencionais, mesmo assim elas alcançam desempenho de proteção a UV-A aceitável ou ainda elevado.

No entanto, como conhecido na técnica, radiação UV também pode levar a reações fotoquímicas que produzem produtos que interferem com o metabolismo da pele. Estes produtos de reação fotoquímica são predominantemente compostos de radical livre (por exemplo, radicais hidroxila).

- 5 Fotoprodutos de radical livre não definidos que se formam na própria pele também podem demonstrar reações secundárias descontroladas como um resultado de sua reatividade elevada. No entanto, singlete oxigênio, um estado excitado não de radical livre da molécula de oxigênio, também pode surgir durante a irradiação UV, como podem epóxidos de vida curta e muitos
- 10 outros. O singlete oxigênio, por exemplo, diferente de tripleto oxigênio normal (estado base de radical livre) devido à sua aumentada reatividade. No entanto, estados tripletos de "radical livre" reativos, excitados, da molécula de oxigênio também podem existir. Assim, a fim de evitar estas reações, antioxidantes e/ou removedores de radical livre, encontram uso em formulações
- 15 cosméticas e/ou dermatológico.

- Os compostos que são comumente usados como agentes de proteção à luz em formulações de proteção à luz cosméticas e/ou dermatológicas são geralmente caracterizadas como provendo uma boa proteção à luz. No entanto, existem desvantagens em que elas são às vezes difíceis de
- 20 incorporar nas desejadas formulações em um modo satisfatório.

- Como indicado acima, o fator de proteção solar (FPS) indica quanto mais tempo a pele protegida com a composição de proteção à luz pode ser irradiada antes da reação de eritema que ocorre é igual que a pele não protegida (isto é, dez vezes mais tempo comparado com a pele não protegida para um FPS = 10). Consumidores conhecem bem o significado de
- 25 "FPS" e escolhem produtos de cuidado da pele e/ou do cabelo com base nos valores FPS indicados em produtos. Consumidores esperam receber uma informação confiável dos fabricantes com relação ao fator de proteção solar, principalmente devido a um aumentado conhecimento público sobre a
- 30 associação exposição solar em excesso e câncer de pele, assim como envelhecimento prematuro. Além disso, em algumas parte do mundo, a degradação da camada de ozônio é uma grande preocupação. Dependendo do tipo

de pele e da exposição solar esperada, os consumidores escolhem produtos com FPS maior ou menor. No entanto, parece que se nota uma tendência dos consumidores selecionarem fatores de FPS relativamente elevados, particularmente para produtos a serem aplicados às crianças e os com pele uniforme. Em algumas modalidades, a presente invenção provê composições com concentrações relativamente baixas de substâncias de filtro de proteção à luz convencionais, ainda assim com valores FPS que são aceitáveis para os consumidores.

Em algumas modalidades preferidas, os constituintes básicos das preparações de filtro solar providas pela presente invenção incluem: água ou soluções aquosas, soluções etanólicas aquosas, óleos naturais e/ou quimicamente modificados e/ou óleos sintéticos; gorduras, ceras e substâncias graxas naturais e sintéticas, preferivelmente ésteres de ácidos graxos com álcoois de baixo número de carbono (por exemplo, com isopropanol, propileno glicol ou glicerol), ou ésteres de álcool graxo com ácidos alcanóicos de índice carbono baixo ou com ácidos graxos; álcoois, dióis ou polióis de índice carbono baixo, e seus éteres, preferivelmente etanol, isopropanol, propileno glicol, glicerol, etileno glicol, éter monoetílico ou monobutílico de etileno glicol, monometílico de propileno glicol, éter monoetílico ou monobutílico, éter monometílico ou monoetílico de dietileno glicol e produtos análogos. Em modalidades alternativamente preferidas, misturas de dois ou mais destes constituintes encontram uso na presente invenção.

O termo "lipídeo" é com freqüência usado como um termo genérico para se referir a gorduras, óleos, ceras e similares. Além disso, os termos "fase óleo" e "fase lipídeo" são também usados como sinônimo. No entanto, óleos e gorduras diferem uns dos outros em sua polaridade, o que é difícil de definir. Foi proposto adotar a tensão interfacial para água como uma medida do índice de polaridade index de um óleo o fase oleosa. Assim, contempla-se que a tensão interfacial pode ser considerada como uma medida apropriada de polaridade de um dado componente de óleo. A "tensão interfacial" é a força que atua em uma linha imaginária de um metro em comprimento nas interface entre duas fases. Neste medida, quanto menor a

tensão interfacial entre a fase óleo e água, maior a polaridade da fase oleosa sendo analisada. A unidade física para esta tensão interfacial é convencionalmente calculada de relação força/ comprimento e é geralmente expressada em mN/m (millinewtons dividido por metros). Ela tem um sinal positivo caso se empenhe em reduzir a interface. No caso inverso, tem um sinal negativo. Como usado aqui, lipídeos são considerados como "polares" se sua tensão interfacial para água for água menor do que 30 mN/m.

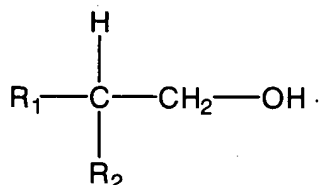
"Óleos polares" incluem os do grupo de lecitinas e de triglicerídeos de ácido graxo, ou seja os ésteres triglicerol de ácidos alcanos carboxílico saturados e/ou insaturados, ramificados e/ou não ramificados tendo um comprimento de cadeia de 8 a 24, em particular 12 a 18, átomos de carbono. Em algumas modalidades, os triglicerídeos de ácido graxo são escolhidos dentre o grupo consistindo em óleos sintéticos, semi-sintéticos e naturais (por exemplo, azeite de oliva, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de nozes trituradas, óleo de colza, óleo de amêndoas, óleo de palma, óleo de coco, óleo de rícino, óleo de germe de trigo, óleo de semente de uva, óleo de cravo, óleo de primula da primavera, óleo de noz de macadame e outros). No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a composições que contêm óleos polares particulares. Exemplos adicionais de óleos polares que encontram uso na presente invenção incluem o grupo de ésteres de ácidos alcano carboxílicos saturados e/ou insaturados, ramificados e/ou não ramificados tendo um comprimento de cadeia de 3 a 30 átomos de carbono e saturado e/ou insaturado, ramificados e/ou não ramificados álcoois tendo um comprimento de cadeia de 3 a 30 átomos de carbono, e do grupo de ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos e saturados e/ou álcoois insaturados, ramificados e/ou não ramificados tendo um comprimento de cadeia de 3 a 30 átomos de carbono. Em algumas modalidades, estes óleos de éster são de miristato de isopropila, palmitato de isopropila, estearato de isopropila, oleato de isopropila, estearato de n-butila, laurato de n-hexila, oleato de n-decila, estearato de isooctila, estearato de isononila, isononanoato de isononila, palmitato de 2-etilhexila, laurato de 2-etilhexila, estearato de 2-hexildecila, palmitato de 2-octildodecila, oleato de oleíla, erucato de

oleíla, oleato de erucila, erucato de erucila e misturas sintéticas, semi-sintéticas e naturais destes ésteres (por exemplo, óleo de jojoba).

Além disso, em algumas modalidades, a fase oleosa é escolhida dentre o grupo consistindo em éteres de dialquila, assim como álcoois saturados ou insaturados, e ramificados ou não ramificados. Em algumas modalidades particularmente preferidas, a fase oleosa das composições das modalidades preferidas também contém benzoato de C₁₂₋₁₅-alquila, enquanto em modalidades alternativas, as modalidades preferidas contém somente o último. Em outras modalidades adicionais, a fase óleo é escolhida dentre o grupo de álcoois Guerbet (isto é, o grupo de álcoois denominados por Marcel Guerbet que primeiro descreveu sua preparação). Estes álcoois são formados de acordo com a equação:



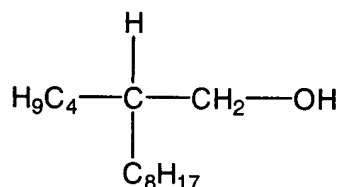
por oxidação de um álcool em um aldeído, por condensação aldol do aldeído, eliminação de água do aldol e hidrogenação do alil aldeído. Álcoois Guerbet são líquidos ainda em baixas temperaturas e resultam em virtualmente nenhuma irritação da pele. Assim, eles encontram uso como constituintes de lubrificação, superlubrificação e também relubrificação em composições de cuidado da pele e de cuidado do cabelo. De fato, o uso de álcoois Guerbet é conhecido na técnica da cosmética. Nestas aplicações, as espécies são geralmente caracterizadas como tendo a seguinte estrutura:



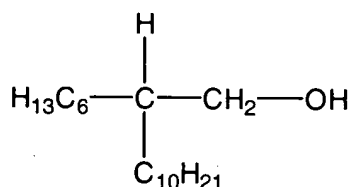
Nesta estrutura, R₁ e R₂ são geralmente radicais alquila não ramificados. Em algumas modalidades preferidas da presente invenção, os seguintes álcoois Guerbet em que

R₁ é propila, butila, pentila, hexila, heptila ou octila e/ou R₂ é hexi-

la, heptila, octila, nonila, decila, undecila, dodecila, tridecila ou tetradecila encontram uso na presente invenção. Em modalidades adicionais, álcoois Guerbet preferidos incluem 2-butil octanol com a seguinte estrutura química:



- que é comercialmente disponível, por exemplo, sob nome comercial ISO-FOL® 12 (Condea Chemie GmbH), e 2-hexildecanol com a seguinte estrutura química:



que é comercialmente disponível, por exemplo, sob nome comercial ISO-FOL® 16 (Condea Chemie GmbH).

- Em modalidades adicionais, misturas de álcoois Guerbet encontram uso em composições da presente invenção. Por exemplo, misturas de 2-butil octanol e 2-hexildecanol encontram uso em algumas modalidades. A quantidade total de álcoois Guerbet nas preparações cosméticas ou dermatológicas acabadas é selecionada dentre a faixa de até cerca de 25,0% em peso, preferivelmente cerca de 0,5 a cerca de 15,0% em peso, com base no peso total da preparações. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer concentração particular nem faixa de concentrações, como os versados na técnica sabem como para preparar as composições tendo concentrações apropriadas para as desejadas composições e seus uso(s). Além disso, contempla-se que qualquer mistura de componentes de óleo e/ou cera irá encontrar uso na presente invenção. Por exemplo, em algumas modalidades, ceras (por exemplo, palmitato de cetila) encontra uso como o único componente lipídeo da fase óleo. Em modalidades adicionais, óleos não polares (por exemplo, os que são escolhidos dentre o grupo de hidrocarbonetos ramificados e não ramificados e ceras de hidrocarbonetos, em particular VASELINE® [isto é, petrolato], parafina, óleo

de esqualano e esqualeno, poliolefinas e poliisobutenos hidrogenados encontram uso na presente invenção. Em algumas modalidades contendo poliolefinas, polidecenos são as substâncias preferidas.

Componentes graxos e/ou ceras que encontram uso em modalidades da presente invenção incluem mas não são limitados a ceras vegetais, ceras animais, ceras minerais e ceras petroquímicas. Exemplos de ceras particularmente preferidas incluem cera candelila, cera de carnaúba, cera japan, cera de gramínea esparto, cera de cortiça, cera guaruma, cera de óleo de germe de arroz, cera de cana de açúcar, cera de bagos, cera de ouricuri, cera montana, cera de jojoba, cera de manteiga de carité, cera de abelha, cera shellac, cachalote, lanolina (cera de lã, gordura uropigial, ceresina, ozokerita (cera de terra), ceras de parafina e ceras microcristalinas.

Adicionais componentes graxos e/ou ceras que encontram uso na presente invenção incluem ceras e/ou ceras sintéticas quimicamente modificadas (por exemplo, as comercialmente disponíveis sob nomes comerciais SYNCROWAX® HRC [tribeenato de glicerila] e SYNSCROWAX® AW 1C [C₁₈-C₃₆ ácido graxo], que são disponíveis de CRODA GmbH), e ceras de éster montana, ceras Sasol, ceras jojoba hidrogenadas, ceras de abelha sintéticas ou modificadas (por exemplo, cera de abelha dimeticona copoliol e/ou cera de abelha C₃₀₋₅₀ alquila), ceras de polialquileno, ceras de polietileno glicol, assim como gorduras quimicamente modificadas (por exemplo, óleos vegetais hidrogenados, como óleo de rícino hidrogenado e/ou glicerídeos graxos de coco hidrogenado), triglicerídeos (por exemplo, trihidroxistearina, ácidos graxos, ésteres de ácido graxo, e ésteres de glicol, como, estearato de C₂₀-C₄₀-alquila, estearato de C₂₀-C₄₀-alquilhidroxistearoíla e/ou glicol montanato). Em outras modalidades, a presente invenção compreende alguns compostos de organossilicone, que tem propriedades físicas similares para os componentes graxos e/ou ceras especificados (por exemplo, estearoxi-trimetilsilano). Em modalidades adicionais, os componentes graxos e/ou ceras são providos individualmente, enquanto em ainda outras modalidades, eles são providos como uma mistura. De fato, pretende-se que qualquer mistura desejada destes componentes de óleo e/ou cera encontrem uso em vá-

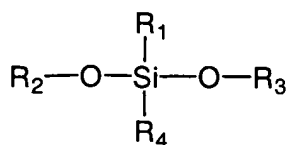
rias modalidades da presente invenção.

Em algumas modalidades, a fase oleosa é selecionada dentre o grupo consistindo em isostearato de 2-etilhexila, octildodecanol, isononanoato de isotridecila, isoeicosano, cocoato de 2-etilhexila, benzoato de C₁₂-C₁₅-alquila, triglicerídeo caprílico/caprico, e éter dicaprílico. Em modalidades alternativas, misturas de várias fases oleosas são providas, incluindo mas não limitadas a misturas compreendendo um ou mais dentre octildodecanol, triglicerídeo caprílico/caprico, éter dicaprílico, benzoato de C₁₂-C₁₅-alquila, isostearato de 2-etilhexila, isononanoato de isotridecila. A seguinte tabela apresenta uma lista de lipídeos que encontram uso sozinhos ou em combinação com outros lipídeos em várias modalidades da presente invenção. As tensões interfaciais correspondentes para água são dadas na última coluna. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a estes componentes específicos, como outros componentes encontram uso em várias modalidades da presente invenção, incluindo misturas de componentes mais ou menos polares e similares.

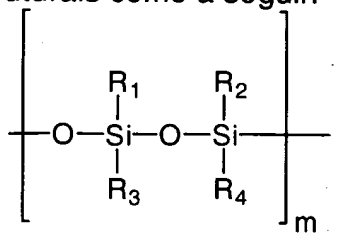
LIPÍDEOS		
nome comercial	NOME INCI	(m/Nm)
ISOVOL® 14 T	Butil Decanol + Hexil Decanol + Hexil Octanol + Butil Octanol	27,6
ISOVOL® 16	Hexil Decanol	24,3
EUTANOL® G	Octildodecanol	24,8
CETIOL® OE	Éter dicaprílico	22,1
MIGLYOL® 812	Triglicerídeo Caprílico/Caprico	21,3
CEGESOFT® C24	Palmitato de octila	23,1
Estearato de isopropila	Estearato de isopropila	21,9
ESTOL® 1540 EHC	Octanoato de octila	30,0
FINSOLV® TN	Benzoato de C ₁₂ -C ₁₅ alquila	21,8
CETIOL® SN	Isononanoato de cetearila	28,6
DERMOFEEL® BGC	Dicaprilato/Dicaprato de butileno Glicol	21,5
TRIVENT® OCG	Tricaprilina	20,2
MOD	Miristato de octildodeceila	22,1

LIPÍDEOS		
nome comercial	NOME INCI	(m/Nm)
ISOVOL® 14 T	Butil Decanol + Hexil Decanol + Hexil Octanol + Butil Octanol	27,6
ISOVOL® 16	Hexil Decanol	24,3
EUTANOL® G	Octildodecanol	24,8
CETIOL® OE	Éter dicaprilílico	22,1
MIGLYOL® 812	Triglicerídeo Caprílico/Capríco	21,3
CEGESOFT® C24	Palmitato de octila	23,1
Estearato de isopropila	Estearato de isopropila	21,9
ESTOL® 1540 EHC	Octanoato de octila	30,0
FINSOLV® TN	Benzoato de C ₁₂ -C ₁₅ alquila	21,8
CETIOL® SN	Isonanoato de cetearila	28,6
DERMOFEEL® BGC	Dicaprilato/Dicaprato de butileno Glicol	21,5
TRIVENT® OCG	Tricaprilina	20,2
COSMACOL® ETI	Tartarato de Di-C ₁₂ -C ₁₃ Alquila	29,4
MIGLICOL® 829	Succinato de diglicerila caprílico/cáprico	29,5
PRISORINE® 2036	Isoestearato de octila	29,7
TEGOSOFT® SH	Heptanoato de estearila	28,7
ABIL® Cera 9840	Cetil dimeticona	25,1
CETIOL® LC	Coco-Caprilato/Caprato	24,8
IPP	Palmitato de isopropila	22,5
LUVITOL® EHO	Octanoato de cetearila	28,6
CETIOL® 868	Estearato de octila	28,4

Em algumas modalidades, alguma parte ou toda a fase óleo das preparações é selecionada dentre o grupo consistindo em silicones cíclico e/ou linear que são também com freqüência referidos como "óleos de silicone." Em algumas modalidades, estes silicones ou óleos de silicone estão presentes como monômeros que são geralmente caracterizados por elementos estruturais como a seguir:

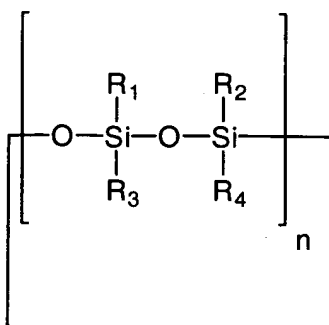


Silicones tendo duas ou mais unidades siloxila que encontram uso em algumas modalidades da presente invenção são geralmente caracterizados por elementos estruturais como a seguir:



em que os átomos de silício podem ser substituídos por radicais alquila e/ou
5 radicais arila idênticos ou diferentes, que são representados em termos gerais pelo radicais R_1 a R_4 , onde vários diferentes radicais não são necessariamente limitados a 4 e podem assumir valores de 2 a 200.000.

10 Silicones cíclicos a serem usados com vantagem de acordo com a invenção são geralmente caracterizados pelo elementos estruturais como a seguir



em que os átomos de silício podem ser substituídos por radicais alquila e/ou
radicais arila idênticos ou diferentes, que são representados em termos gerais pelo radicais R_1 a R_4 , onde vários diferentes radicais não são necessariamente limitados a 4, n pode assumir valores de 3/2 a 20. Valores fracionais
15 para " n " levam em consideração que números impares de grupos siloxila podem estar presentes no ciclo.

Em algumas modalidades, feniltrimeticona é selecionada como um óleo de silicone. Outros óleos de silicone apropriados para uso em várias

modalidades da presente invenção incluem, mas não são limitados a dimeticona, fenildimeticona, ciclometicona (octametilciclotetrassiloxano), hexametilciclotrissiloxano, polidimetilsiloxano, poli(metilfenilsiloxano), cetildimeticona, e beenoxidimeticona. Em modalidades alternativas, misturas destes compostos encontram uso na presente invenção, incluindo mas não limitadas a misturas de ciclometicona e isononanoato de isotridecila, e misturas de ciclometicona e isoestearato de 2-etilhexila. Em ainda modalidades adicionais, óleos de silicone de similar constituição, como os compostos referidos aos acima cujas cadeias de ácido orgânico foram derivatizadas (por exemplo, polietoxiladas e/ou polipropoxiladas) encontram uso na presente invenção. Estes incluem, mas não são limitados tais compostos como copolímeros polissiloxano-polialquil-poliéter como cetildimeticona copoliol (isto é, cetildimeticona copoliol (e) poligliceril-4 isoestearato (e) laurato de hexila). De fato, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer óleo de silicone específico nem mistura de óleos de silicone, como vários óleos encontram uso em várias modalidades da presente invenção.

Em modalidades adicionais, emulsões água em óleo (A/O) encontram uso na presente invenção. Em algumas modalidades, emulsificantes A/O são usados com ou sem co-emulsificantes adicionais. Em ainda outras modalidades, emulsões A/O da presente ainda compreendem um ou mais emulsificantes, incluindo, mas não limitados a um ou mais dos seguintes compostos: lecitina, lanolina cera microcristalina (Cera microcristalina) em mistura com óleo de parafina (parafina líquida), ozokerita, óleo de rícino hidrogenado, poligliceril-3 oleato, misturas de cera de lã ácido, misturas de cera de lã álcool, isostearato de pentaeritritol, poligliceril-3 diisostearato, cera de abelha (Cera alba) e ácido esteárico, dihidroxicetilfosfato de sódio em uma mistura com éter hidroxietílico de isopropila, dioleato de metilglicose, dioleato de metilglicose em uma mistura com hidroxiestearato e cera de abelha, óleo mineral em uma mistura com petrolato e ozokerita e oleato de glicerila e álcool lanolínico, petrolato em uma mistura com ozokerita e óleo de rícino hidrogenado e isoestearato de glicerila e oleato de poligliceril-3, PEG-7 óleo de rícino hidrogenado, ozokerita e óleo de rícino hidrogenado, isostea-

rato de poligliceril-4, isoestearato de poligliceril-4 em uma mistura com cetildimeticona copoliol e laurato de hexila, laurilmeticona copoliol, cetildimeticona copoliol, polímero reticulado acrilato/ acrilato de C₁₀-C₃₀-alquila, Poloxâ-
 5 mero 101, dipoli-hidróxi estearato de poligliceril-2, diisoestearato de poligliceril-3, dipoli-hidroxiestearato de poligliceril-4, dipoli-hidroxiestearato PEG-30, poligliceril-3 diisoestearato de diisostearoila, dipoli-hidróxi estearato de poligliceril-2, dipoli-hidróxi estearato de poligliceril-3, dipoli-hidróxi estearato de poligliceril-4, dioleato de poligliceril-3.

Em outras modalidades adicionais da presente invenção, emul-
 10 sões A/O da presente invenção compreendem um ou mais coemulsificantes, incluindo, mas não limitado aos seguintes: estearato de glicerila em uma mistura com cetareth-20, cetareth-25, cetareth-6 em uma mistura com álcool estearílico, álcool cetilstearílico em uma mistura com óleo de rícino PEG-40 e cetilstearila sulfato de sódio, fosfato tricetareth-4, cetilstearyl sul-
 15 fato de sódio, trilaureth-4 fosfato de lecitina, fosfato laureth-4, ácido esteárico, estearato de propileno glicol SE, óleo de rícino hidrogenado PEG-25, óleo de rícino hidrogenado PEG-54, glicerídeos caprílico/caprico PEG-6, oleato de glicerila em uma mistura com propileno glicol, ceteth-2, ceteth-20, polissorbato 60, estearato de glicerila em uma mistura com estearato PEG-
 20 100, laureth-4, cetareth-3, éter de isostearil glicerila, álcool cetilestearílico em uma mistura com sódio cetilestearílico sulfato, laureth-23, steareth-2, glicerila estearato em uma mistura com estearato PEG-30, estearato PEG-40, distearato glicol, copolímero PEG-22 dodecil glicol, estearato de poligliceril-2 PEG-4, cetareth-20, sesquiestearato de metilglicose, steareth- 10,
 25 estearato de PEG-20, steareth-2 em uma mistura com distearato PEG-8, steareth-21, steareth-20, isosteareth-20, copolímero PEG-45/dodecil glicol, copolímero metóxi-PEG-22/dodecil glicol, estearato de glicerila PEG-20, cera de abelha PEG-8, laurato de poligliceril-2, succinato de isostearil diglicerila, fosfato de cloreto de estearamidopropil PG dimônio, estearato de glicerila
 30 SE, ceteth-20, citrato de trietila, sesquiestearato de metilglicose PEG-20, cetareth-12, citrato estearato de glicerila, fosfato de cetila, fosfato tricetareth-4, fosfato trilaureth-4, distearato de poliglicerila metilglicose, cetil fosfato de

$$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{H}_3\text{C}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{CH}_3 \\ | \quad | \quad | \quad | \quad | \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \quad (\text{CH}_2)_3 \quad \text{CH}_3 \\ \quad \quad \quad \quad | \\ \quad \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \quad | \\ \quad \quad \quad \quad \text{C}_2\text{H}_4-\text{O}-\text{C}_3\text{H}_6\text{O}-\text{X} \end{array}$$

em que X e Y, independentemente um do outro, são escolhidos dentre o grupo H e os grupos alquila ramificados e não ramificados, grupos acila e grupos alcóxi tendo 1 a 24 átomos de carbono, p é um número de 0 a 200, q é um número de 1 a 40, e r é um número de 1 a 100. Alguns exemplos de emulsificantes de silicone que encontram uso na presente invenção incluem, mas não são limitados a dimeticona copolióis (por exemplo, ABIL[®] B 8842, ABIL[®] B 8843, ABIL[®] B 8847, ABIL[®] B 8851, ABIL[®] B 8852, ABIL[®] B 8863, ABIL[®] B 8873, e ABIL[®] B 88183, todos sendo comercialmente disponíveis de Th. Goldschmidt AG). Um exemplo adicional de substâncias ativas nas interface que encontra uso na presente invenção inclui cetildimeticona copoliol (ABIL[®] EM 90), assim como ciclometiconadimeticona copoliol (ABIL[®] EM 97), ambos sendo comercialmente disponíveis de Th. Goldschmidt AG. Um emulsificante adicional que tem demonstrado ser utilizável em várias composições que encontra uso em modalidades da presente invenção é laurilmeticona copoliol (auxiliar de formulação Dow Corning[®] 5200), que é comercial-

mente disponível de Dow Corning Ltd.

Em modalidades preferidas da presente invenção, a quantidade total de emulsificantes usados nas composições de cuidado pessoal (por exemplo, preparações cosméticas ou de cuidado da pele) estão presentes nas faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10,0% em peso, preferivelmente cerca de 0,5 a cerca de 5,0% em peso, com base no peso total da preparações. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer concentração específica de emulsificante e/ou co-emulsificante, as várias modalidades da presente invenção tendo concentrações e/ou faixas de concentração diferentes preferidas.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê emulsões em várias formas, incluindo cremes de proteção da pele, loções para a pele, leites cosméticos, cremes de filtro solar, e leites de proteção solar. Em algumas modalidades preferidas, estas composições compreendem gorduras, óleos, ceras, e/ou outras substâncias graxas, assim como água, e um ou mais emulsificantes como são comumente usados este tipo de formulação.

Além das emulsões líquidas e um pouco mais sólidas das loções cosméticas de limpeza e/ou cremes de limpeza da presente invenção, a presente invenção também provê preparações de limpeza pulverizáveis ("pulverizações de limpeza"), que são usadas, por exemplo, para remover a maquiagem ou como loção de limpeza suave. Além disso, estas pulverizações de limpeza encontram uso em aplicações para o tratamento de pele com sinais. Estas preparações de limpeza também encontram uso como "preparações de enxágüe" (isto é, produtos que são enxaguados da pele após a aplicação).

Além dos constituintes acima, várias modalidades da presente invenção incluem componentes adicionais, como auxiliares e aditivos, incluindo mas não limitados a agentes avolumadores, cargas, perfume, corantes, emulsificantes, ingredientes ativos adicionais (por exemplo, vitaminas e proteínas), agentes de proteção à luz, estabilizadores, repelentes de insetos, álcool, substâncias de auto-bronzamento, água, sais, antimicrobianos, proteases, e/ou ceratinase, etc. De fato, não se pretende que a presente inven-

ção seja limitada a qualquer componente particular, desde que o componente ativo compreendendo um esqueleto e um peptídeo seja incluído. Ainda é contemplado que a presente invenção irá encontrar uso em numerosas e variadas preparações medicinais.

5 Em algumas modalidades preferidas, a presente invenção provê preparações tópicas cosméticas e/ou dermatológicas apropriados para uso como cremes de proteção da pele, leites de limpeza, loções de filtro solar, cremes nutritivos, cremes diurnos, cremes noturnos etc. Em algumas modalidades, a presente invenção encontra uso em componentes de composições
10 farmacêuticas (isto é, fármacos). Em modalidades adicionais, a presente invenção encontra uso em cosméticos decorativos (por exemplo, formulações de maquiagem).

 Em algumas modalidades particularmente preferidas, a presente invenção provê filtros solares utilizáveis em preparações cosméticas e/ou de
15 cuidado da pele. Além do ingrediente ativo usado de acordo com as modalidades da presente invenção, em algumas modalidades, estas preparações preferivelmente adicionalmente compreendem pelo menos um filtro de banda larga, e/ou pelo menos uma substância de filtro UVA e/ou pelo menos uma substância de filtro UVB e/ou pelo menos um pigmento inorgânico.

20 Em ainda outras modalidades, a presente invenção provê composições de cuidado pessoal que tem componentes de proteção UV, mas que não são primariamente filtros solares. Por exemplo, em algumas modalidades, substâncias de filtro UV-A e/ou UV-B incorporadas em cremes diurnos e/ou composições de cuidado do cabelo.

25 Em modalidades adicionais, as composições de cuidado pessoal da presente invenção compreendem ingredientes cosmeticamente ativos, auxiliares e/ou aditivos, como são comumente usados em tais preparações (por exemplo, antioxidantes, conservantes, bacteriocidas, perfumes, antiespumantes, corantes, pigmentos que tem uma ação de coloração, espessantes,
30 substâncias tensoativas, emulsificantes, emolientes, umectantes e/ou umedecedores, gorduras, óleos, ceras ou outros constituintes comuns de uma formulação cosmética ou dermatológica, como álcoois, polióis, polímeros,

estabilizadores de espuma, eletrólitos, solventes orgânicos ou derivados de silicone). De fato, contempla-se que várias compostos irão encontrar uso nas várias modalidades da presente invenção, como apropriado para o produto e o usuário.

- 5 Em ainda outras modalidades, conservantes, como os usados em aplicações em alimentos e rações encontram uso em várias composições da presente invenção. A seguinte tabela apresenta uma lista de tais compostos, assim como o número E para cada composto. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a estes conservantes es-
- 10 pecíficos, como Contempla-se que conservantes adicionais irão encontrar uso em várias modalidades da presente invenção.

Exemplos de conservantes de tipo alimentício que encontram uso em modalidades da presente invenção			
E 200	ácido sórbico	e 227	hidrogeno sulfito de cálcio
E 201	sorbato de sódio	e 228	hidrogeno sulfito de potássio
E 202	sorbato de potássio	e 230	bifenil (difenil)
E 203	sorbato de cálcio	e 231	ortofenilfenol
E 210	ácido benzóico	e 232	ortofenilfenóxido de sódio
E 211	benzoato de sódio	e 233	tiabendazol
E 212	benzoato de potássio	e 235	natamicina
E 213	benzoato de cálcio	e 236	ácido fórmico
E 214	p-hidroxibenzoato de etila	e 237	formiato de sódio
E 215	sal na de éster etílico p-hidroxibenzóico	e 238	formiato de cálcio
E 216	p-hidroxibenzoato de n-propila	e 239	hexametilenotetramina
E 217	sal Na de éster p-hidroxibenzoico-n-propílico	e 249	nitrito de potássio
E 218	p-hidroxibenzoato de metila	e 250	nitrito de sódio
E 219	sal Na de éster p-hidroxibenzóico metílico	e 251	nitrito de sódio
E 220	dióxido de enxofre	e 252	nitrito de potássio

Exemplos de conservantes de tipo alimentício que encontram uso em modalidades da presente invenção

E 200	ácido sórbico	e 227	hidrogeno sulfito de cálcio
E 201	sorbato de sódio	e 228	hidrogeno sulfito de potássio
E 202	sorbato de potássio	e 230	bifenil (difenil)
E 203	sorbato de cálcio	e 231	ortofenilfenol
E 221	sulfito de sódio	e 280	ácido propiônico
E 222	hidrogenossulfito de sódio	e 281	propionato de sódio
E 223	dissulfito de sódio	e 282	propionato de cálcio
E 224	dissulfito de potássio	e 283	propionato de potássio
E 226	sulfito de cálcio	e 290	dióxido de carbono

Conservantes adicionais que encontram uso em várias modalidades incluem mas não são limitados adibromodicianobutano (2-bromo-2-bromometilglutarodinitrila), 3-iodo-2-propinilbutil carbamato, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, imidazolidiniluréia, 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona, 2-cloroacetamida, cloreto de benzalcônio, álcool benzílico, e doadores de formaldeído. Outros conservantes que encontram uso em várias modalidades da presente invenção incluem éteres de fenil hidroxialquila, em particular os compostos conhecidos como "fenoxietanol", devido a seus efeitos bactericidas e fungicidas sobre vários microorganismos.

Ainda outros agentes antimicrobianos são do mesmo modo apropriados para uso em várias modalidades da presente invenção, incluindo mas não limitadas a éter 2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifenila (isto é, IRGASAN®), 1,6-di(4-clorofenilbiguanido)hexano (isto é, CHLORHEXIDIN), 3,4,4'-triclora-carbanilida, compostos de amônio quaternário, óleo de cravo, hortelã, óleo de timo, óleo de citrato de trietila, FARNESOL® (3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol) e os ingredientes e/ou combinações de ingredientes ativos descritos em DE-37 40 186, DE-39 38 140, DE-42 04 321, DE-42 29 707, DE-43 09 372, DE-44 11 664, DE-195 41 967, DE-195 43 695, DE-195 43 696, DE-195 47 160, DE-196 02 108, DE-196 02 110, DE-196 02 111, DE-196 31 003, DE-196 31 004, DE-196 34 019, DE-42 29 737, DE-42 37 081, DE-43

24 219, DE-44 29 467, DE-44 23 410, e DE-195 16 705, todos sendo aqui incorporados por referência. Em ainda outras modalidades, hidrogenocarbonato de sódio é também incluído em algumas composições da presente invenção. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer antimicrobiano particular nem combinação de antimicrobianos, como vários compostos tendo estes efeitos irão encontrar uso em várias modalidades da presente invenção.

Em modalidades adicionais das composições de cuidado pessoal da presente invenção, compostos como ativos antiirritantes e/ou antiinflamatórios são incluídos. Em algumas modalidades, álcool batílico (éter de α -octadecila glicerila), álcool selaquílico (éter de α -9-octadecenil glicerila), álcool quimílico (éter de α -hexadecila glicerila), bisabolol, e/ou pantenol são incluídos. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitado a incorporação de quaisquer antiirritante(s) e/ou antiinflamatório (s) específica, como vários compostos apropriados para estas aplicações encontram uso na presente invenção.

Em ainda outras modalidades da presente invenção, antioxidantes são incorporados nas composições de cuidado pessoal. Contempla-se que quaisquer antioxidantes apropriados irão encontrar uso nas composições de cuidado pessoal da presente invenção. Antioxidantes apropriados incluem, mas não são limitados a aminoácidos (por exemplo, glicina, histidina, tirosina, e triptofano) e seus derivados, imidazóis (por exemplo ácido urocânico) e seus derivados, peptídeos (por exemplo, D,L-carnosina, D-carnosina, e L-carnosina) e seus derivados (por exemplo, anserina), carotenóides, carotenos (por exemplo, α -caroteno, β -caroteno, e γ -licopeno) e seus derivados, ácido clorogênico e seus derivados, aurotioglicose, propiltiouracila e outros tióis (por exemplo, tioredoxina, glutathione, cisteína, cistina, cistamina e os ésteres de glicosila, N-acetila, metila, etila, propila, amila, butila e laurila, palmitoíla, oleíla, γ -linoleíla, colesterila e glicerila dos mesmos) e seus sais, tiodipropionato de dilaurila, tiodipropionato de distearila, ácido tiodipropiônico e seus derivados (por exemplo, ésteres, éteres, peptídeos, lipídeos, nucleotídeos, nucleosídeos e sais), e compostos sulfoximina (por e-

xemplo butionina sulfoximinas, homocisteína sulfoximina, butionina sulfonas, penta-, hexa-, e heptationina sulfoximina) em doses toleradas muito pequenas, (por exemplo, tipicamente pmol a mmol/kg), agentes quelantes (por exemplo, ácidos graxos α -hidróxi, ácido palmítico, ácido fítico, e lactoferrina), ácidos α -hidróxi (por exemplo ácido cítrico, ácido láctico, e ácido málico), ácido úmico, ácido de bile, extratos de bile, bilirrubina, biliverdina, EDTA, EGTA e seus derivados, ácidos graxos insaturados e seus derivados (por exemplo, ácidos linolênicos, ácido linoléico, ácido oléico), ácido fólico e seus derivados, furfurilidenosorbitol e seus derivados, ubiquinona e ubiquinol e seus derivados, vitamina C e seus derivados (por exemplo, ascorbil fosfato de sódio, palmitato de ascorbila, fosfato de Mg ascorbila, e acetato de ascorbila), tocoferóis e derivados (por exemplo, acetato de vitamina E), benzoato de coniferila de resina benzoína, ácido ferúlico, furfurilidenoglucitol, carnosina, hidroxitolueno de butila, hidroxianisol de butila, ácido nordihidroguaiácico, ácido nordihidroguaiaretico, trihidróxi butirofenona, ácido úrico e seus derivados, mannose e seus derivados, zinco e seus derivados (por exemplo, ZnO, ZnSO₄), selênio e seus derivados (por exemplo, selenometionina), estilbenos e seus derivados (por exemplo, óxido de estilbeno, óxido de trans-estilbeno) e seus derivados (por exemplo, sais, ésteres, éteres, açúcares, nucleotídeos, nucleosídeos, peptídeos e lipídeos) de referidos ingredientes ativos que são apropriados para o uso pretendido da forma particular de realização(s) da presente invenção.

Em algumas modalidades, a concentração de um ou mais antioxidantes nas composições da presente invenção é preferivelmente de cerca de 0,001 a cerca de 30% em peso, particularmente preferivelmente de cerca de 0,05 a cerca de 20% em peso, e mais preferivelmente de cerca de 1 a cerca de 10% em peso, com base no peso total da preparação. Em modalidades adicionais, em que vitamina E e/ou seus derivados são utilizados como antioxidante (s), a faixa preferida é de cerca de 0,001 a cerca de 10% em peso, com base no peso total da formulação. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer concentração(ões) de antioxidante específica(s), como várias concentrações irão encontrar uso nas

várias modalidades da presente invenção.

Em outras modalidades adicionais, a presente invenção provê preparações apropriados para uso como desodorantes e/ou antiperspirantes. Contempla-se que qualquer um dos ingredientes ativo que comumente en-

5 encontram uso em tais preparações irão também encontrar uso em várias modalidades da presente invenção. Componentes adicionais que são comumente usados em tais preparações também encontram uso em várias modalidades da presente invenção. Exemplos de tais compostos ativos e inativos incluem, mas não são limitados a mascaradores de odor (por exemplo, per-

10 fumes), absorvedores de odor (por exemplo, filossilicatos descritos em DE-P 40 09 347); assim como montmorilonita, caolinita, illita, beidellita, nontronita, saponita, hectorita, bentonita, esmectita, e sais de zinco de ácido ricinoléico. Em algumas modalidades da presente invenção, a faixa de ingredientes ativos (isto é, um ou mais compostos) em tais preparações é preferivelmente

15 de cerca de 0,001 a cerca de 30% em peso; mais preferivelmente de cerca de 0,05 a cerca de 20% em peso; e o mais particularmente na faixa de cerca de 1 a cerca de 10% em peso, com base no peso total da preparação.

Em algumas modalidades da presente invenção, a fase água tem um caráter de gel que, além de um teor eficaz de compostos e solvente

20 (como apropriado) preferivelmente compreende água, ainda espessantes orgânicos e/ou inorgânicos, e/ou hidrocolóides.

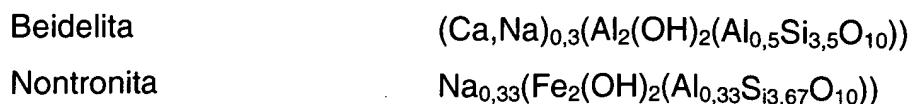
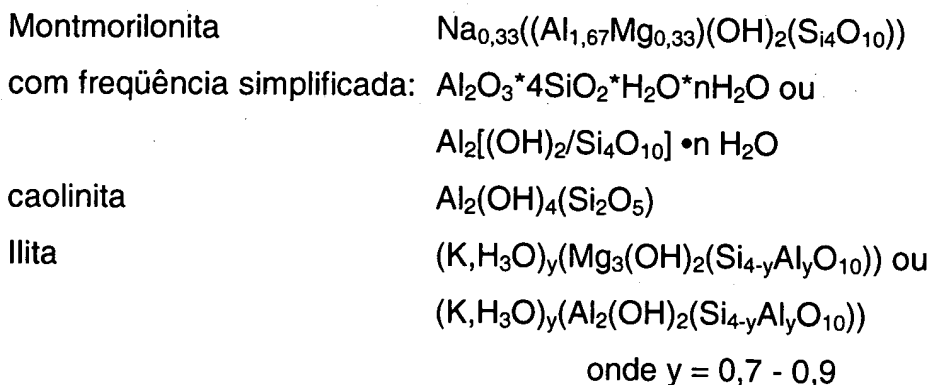
Em algumas modalidades, espessantes inorgânicos são selecionados dentre o grupo consistindo em filossilicatos modificados, não modificados, naturalmente ocorrendo, e sintéticos. Apesar de ser geralmente pre-

25 ferível usar componentes puros, em algumas modalidades, misturas de diferentes filossilicatos modificados e/ou não modificados encontram uso em várias composições da presente invenção. Como geralmente conhecido na técnica, filossilicatos são silicatos e alumossilicatos em que as unidades de silicato ou aluminato são unidas juntas via três ligações Si-O- ou Al-O- e

30 formam uma estrutura de folha ondulada ou de camada. A quarta valência Si-O- ou Al-O- é saturada por cátions. Interações eletrostáticas relativamente fracas (por exemplo ligações de ponte hidrogênio) existem entre as camadas

individuais. A estrutura de camada é muito definida por ligações covalentes, fortes. A estequiometria dos silicatos em folha é $(\text{Si}_2\text{O}_5^{2-})$ para estruturas de silicato puras e $(\text{Al}_m\text{Si}^{2-m}\text{O}_5^{(2+m)-})$ para alumossilicatos, em que "m" é um número maior que zero e menor que 2. Em algumas modalidades em que alumossilicatos estão presentes na ausência de silicatos puros, cada grupo Si^{4+} substituído por Al^{3+} requer outro cátion carregado sozinho para neutralizar a carga. O balanço de carga é preferivelmente nivelado por H^+ , íons de metal alcalino ou íons de metal alcalino-terroso. Em modalidades alternativas, alumínio é usado como um contraíon. Em contraste com os alumossilicatos, estes compostos são referidos como "silicatos de alumínio." "Alumossilicatos de alumínio", em que alumínio está presente tanto a rede de silicato, e também como contraíon, também encontram uso em algumas modalidades da presente invenção.

Filossilicatos são bem-conhecidos na técnica (Ver por exemplo, Hollemann *et al.*, Lehrbuch der Anorganischen Chemie [Textbook of Inorganic Chemistry], 91st-100th Ed., Walter de Gruyter - Verlag [1985]; Remy, Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 12th Ed., Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig [1965]). A estrutura de camada de montmorilonita é também conhecida (vide, Römpps Chemie-Lexikon, Franckh'sche Verlagshandlung, W. Keller & Co., Stuttgart, 8th Ed., [1985], p. 2668 f). Exemplos de filossilicatos incluem os seguintes (montmorilonita é o mineral principal compreendendo as bentonitas ocorrendo naturalmente);



Saponita	$(\text{Ca}, \text{Na})_{0,33}((\text{Mg}, \text{Fe})_3(\text{OH})_2(\text{Al}_{0,33}\text{Si}_{3,67}\text{O}_{10}))$
Hectorita	$\text{Na}_{0,33}((\text{Mg}, \text{Li})_3(\text{OH}, \text{F})_2(\text{Si}_4\text{O}_{10}))$

Em algumas modalidades preferidas, formadores de gel inorgânico incluindo mas não limitados a silicatos de alumínio, como as montmorilonitas (bentonitas, hectoritas e seus derivados, como quaternium-18 bentonita, quaternium-18 hectoritas, estearalcônio bentonitas e estearalcônio hectoritas), e também silicatos de magnésio-alumínio (tipos VEEGUM®), e silicatos de sódio-magnésio (tipos LAPONITE®) encontram uso na presente invenção.

Montmorilonitas representam minerais de argila que são um tipo de esmectitas dioctaédricas, e são massas que intumescem em água, mas não se tornam plásticas. Os pacotes de camadas nas estruturas de três camadas das montmorilonitas podem intumescer como um resultado de incorporação de água reversível (em uma quantidade de duas a 7 vezes) e outras substâncias, como, por exemplo, álcoois, glicóis, piridina, picolina, compostos de amônio, ions hidróxi-aluminossilicato etc. A fórmula química dada acima proporciona apenas uma aproximação da fórmula, como montmorilonitas tem uma grande capacidade para troca iônica. Por exemplo, Al pode ser substituído por Mg, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn, Pb (por exemplo, de substâncias prejudiciais em águas usadas), Cr, Cu e outros elementos. A resultante carga negativa das camadas octaédricas é compensada pela presença de cátions, em particular Na^+ (isto é, montmorilonita de sódio) e Ca^{2+} (isto é, montmorilonita de cálcio, um composto que é somente intumescível em uma extensão muito pequena) em posições intercamadas.

Em modalidades alternativas, silicatos de magnésio e/ou bentonitas sintéticos encontram uso na presente invenção, incluindo mas não limitadas a tais compostos comercialmente disponíveis como OPTIGEL® (Süd-Chemie). Como indicado acima, em algumas modalidades, silicatos de alumínio como os comercialmente disponíveis VEEGUM® (R.T. Vanderbilt Comp., Inc), encontram uso na presente invenção. Vários tipos de VEEGUM® que encontram uso em várias modalidades da presente invenção são providos abaixo.

Tipos de VEEGUM®

	Tipo	HV	K	HS	S-728
	Regular				
SiO ₂	55,5	56,9	64,7	69,0	65,3
MgO	13,0	13,0	5,4	2,9	3,3
Al ₂ O ₃	8,9	10,3	14,8	14,7	17,0
Fe ₂ O ₃	1,0	0,8	1,5	1,8	0,7
CaO	2,0	2,0	1,1	1,3	1,3
Na ₂ O	2,1	2,8	2,2	2,2	3,8
K ₂ O	1,3	1,3	1,9	0,4	0,2
Perda de cinzas	11,1	12,6	7,6	5,5	7,5

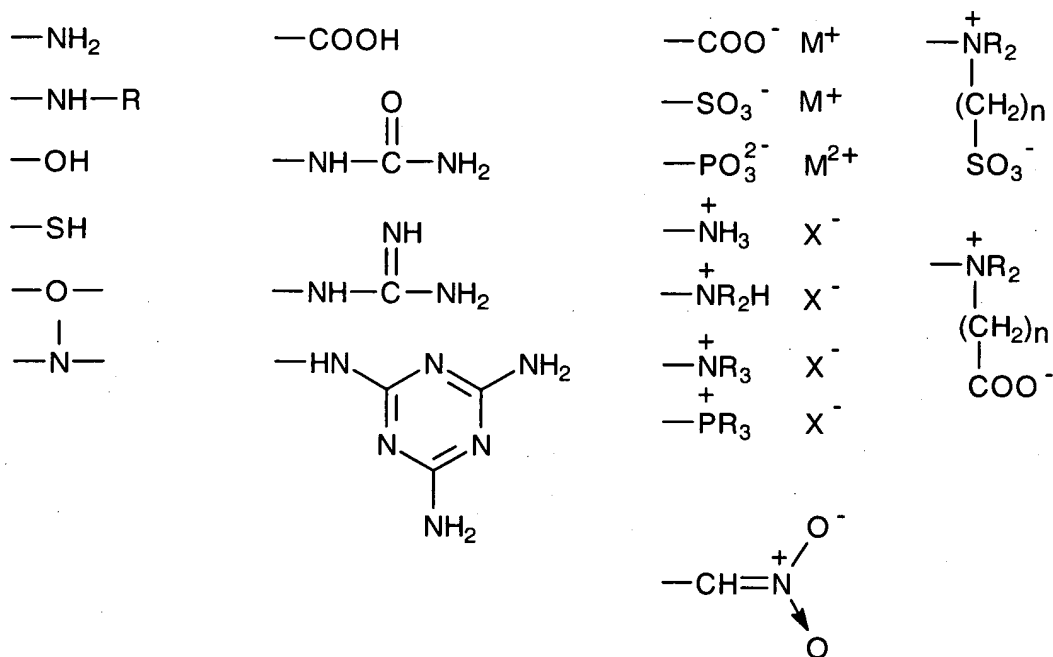
Os produtos acima intumescem em água para formar géis viscosos, que tem uma reação alcalina. A organofilização de montmorilonita ou bentonitas (troca dos cátions intercadas para íons alquilamônio quaternário) produz produtos (bentonas) que são preferivelmente usados para dispersão em solventes orgânicos e óleos, gorduras, ungüentos, tintas, revestimentos de superfície e em detergentes.

BENTONE® é um nome comercial para vários agentes gelificantes neutros e quimicamente inertes que são construídos de sais de amônio orgânicos de cadeia longa, e tipos específicos de montmorilonita. Os agentes gelificantes BENTONE® intumescem em meios orgânicos, que levam os meios a também intumescer. Os géis são resistentes a ácidos diluídos e álcalis, apesar de perderem parcialmente suas propriedades gelificantes quando de contato prolongado com ácidos e álcalis fortes. Devido ao seu caráter organofílico, os agentes gelificantes BENTONE® são somente umectáveis por água com dificuldade. Existem vários tipos de agentes gelificantes BENTONE® comercialmente disponíveis, incluindo os vendidos por Kronos Titan: BENTONE® 27, montmorilonita organicamente modificada; BENTONE® 34 (bentonita de dimetildioctilamônio; preparada de acordo com a Patente US Nºs 2,531,427, incorporada aqui por referência, que, devido a seus grupos lipofílicos, intumescem mais prontamente em meio lipofílico do que em

água); BENTONE® 38, montmorilonita organicamente modificada, disponível como uma pó colorido de creme a branco; BENTONE® LT, um mineral de argila purificado; BENTONE® Gel MIO, montmorilonita organicamente modificada que é fornecida como uma suspensão muito fina em óleo mineral (SUS-71) (10% bentonita, 86,7% óleo mineral e 3,3% agente umectante); BENTONE® Gel IPM, bentonita organicamente modificada que é colocada em suspensão em miristato de isopropila (10% bentonita, 86,7% isopropilmiristato, 3,3% agente umectante); BENTONE® Gel CAO, montmorilonita organicamente modificada que é tomada em óleo de rícino (10% bentonita, 86,7% óleo de rícino e 3,3% agente umectante); BENTONE® Gel Lantrol, montmorilonita organicamente modificada que, em forma de pasta, se destina a posterior processamento, em particular para a preparação, de composições cosméticas; 10% bentonita, 64,9 LANTROL® (óleo de cera de lã), 22,0 de miristato de isopropila, 3,0 agente umectante e 0,1 p-hidroxibenzoato de propila; BENTONE® Gel Lan I, uma pasta de BENTONE® 27 10% de potência em uma mistura de cera de lã USP e palmitato de isopropila; BENTONE® Gel Lan II, uma pasta de bentonita em líquido de cera de lã pura; BENTONE® Gel NV, uma pasta de BENTONE® 27 a 15% potência pasta em ftalato de dibutila; BENTONE® Gel OMS, uma pasta de bentonita em Shellsol T.; BENTONE® Gel OMS 25, uma pasta de bentonita em hidrocarbonetos isoparafínicos (IDOPAR® H); e BENTONE® Gel IPP, uma pasta de bentonita em palmitato de isopropila.

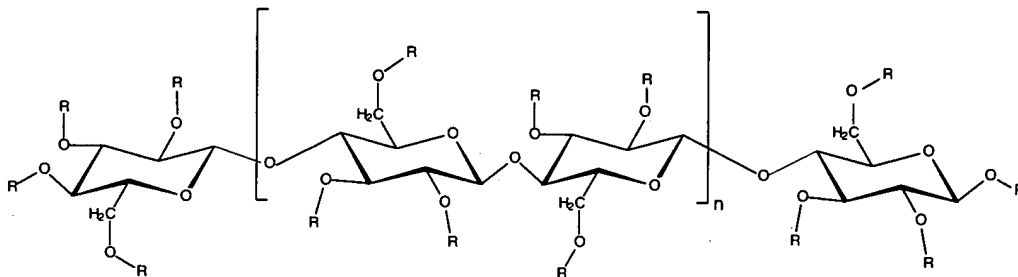
"Hidrocolóide" é a abreviatura tecnológica para o nome mais correto de "colóide hidrofílico." Hidrocolóides são macromoléculas que tem uma estrutura grandemente linear e forças intermoleculares de interação que permitem ligações de valência primária e secundária entre as moléculas individuais para formar uma estrutura reticular. Alguns hidrocolóides são polímeros solúveis em água naturais ou sintéticos que, em sistemas aquosos, formam géis ou soluções viscosas. Estes compostos aumentam a viscosidade de água por ou ligação das moléculas de água (hidratação), ou por absorção e encapsulação da água em suas macromoléculas intertecidas, enquanto limitando a mobilidade de água. Estes polímeros solúveis em água

representam um grande grupo de polímeros naturais e sintéticos que são quimicamente muito diferentes, mas que compartilham um aspecto comum em sua solubilidade em água ou meio aquoso. Um pré-requisito para isto é que estes polímeros tenham vários grupos hidrofílicos suficientes para solubilidade em água e não sejam muito reticulados. Estes grupos hidrofílicos podem ser de natureza não iônica, aniônica ou catiônica, por exemplo como a seguir:



Em algumas modalidades preferidas, o grupo dos hidrocolóides cosmeticamente e dermatologicamente relevantes são divididos nos seguintes grupos: compostos naturais orgânicos (por exemplo, agar-agar, carrageenano, tragacanto, goma arábica, alginatos, pectinas, polioses, farinha de guar, farinha de feijão alfarroba, amido, dextrina, gelatinas, e caseína); substâncias orgânicas, modificadas naturais (por exemplo, carboximetilcelulose e outros éteres de celulose, hidroxietilcelulose e hidroxipropilcelulose e celulose microcristalina); compostos orgânicos completamente sintéticos (por exemplo, compostos poliacrílicos e polimetacrílicos, polímeros de vinila, ácidos policarboxílicos, poliéteres, políiminas, poliamidas, e poliuretanos); e compostos inorgânicos (por exemplo, ácidos polissilícicos, minerais de argila, como montmorilonitas, zeolitas, e sílicas).

Em modalidades alternativas, etilceluloses encontram uso em composições da presente invenção como estabilizadores. Etilceluloses são caracterizadas pelo seguinte estrutura. Nesta estrutura, os Rs são ou grupos etila ou átomos de hidrogênio.



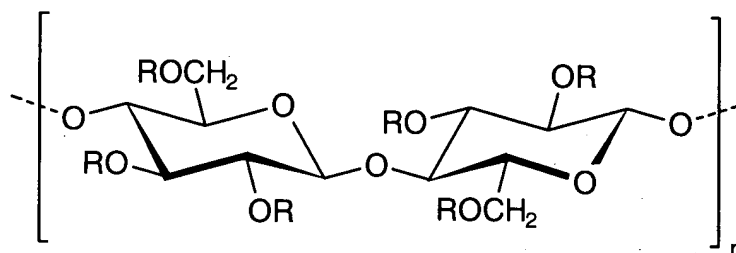
5 Em algumas modalidades preferidas, o grau de etilação na etilcelulose é de cerca de 2,0 a cerca de 3,0, correspondendo a cerca de 40 a cerca de 55%, e mais preferivelmente cerca de 48,0 a cerca de 49,5% de etilação. A massa molecular média é preferivelmente escolhida de modo que a viscosidade de uma solução de aproximadamente 5% de potência em uma
 10 mistura de 80 partes de tolueno e 20 partes de etanol a 25°C é 3 a 110 mPas, e mais preferivelmente 9 a 11 mPas. Em algumas modalidades particularmente preferidas, a massa molar média é de cerca de 100.000 a cerca de 400.000 g/mol. Em algumas modalidades preferidas, a concentração de etilcelulose em composições da presente invenção está na faixa de cerca de
 15 0,1 a cerca de 10% em peso, com base no peso total da preparações. Várias etilceluloses encontram uso na presente invenção, incluindo mas não limitadas às que são comercialmente disponível (por exemplo, ETHOCEL® Standard 10 Premium; Dow Chemicals).

20 Em outras modalidades adicionais, celulose microcristalina encontra uso como hidrocolóide em composições da presente invenção. Várias preparações de celulose microcristalina encontram uso na presente invenção, incluindo mas não limitadas às que são comercialmente disponíveis (por exemplo, AVICEL®, como AVICEL® RC-591, assim como AVICEL® RC/CL; AVICEL® CE-15; e AVICEL® 500; FMC Corporation Food and
 25 Pharmaceutical Products). Em algumas modalidades particularmente preferidas, AVICEL® RC-591 (uma celulose microcristalina modificada que é feita de 89% celulose microcristalina e 11% carboximetilcelulose de sódio) encon-

tra uso na presente invenção.

Hidrocolóides adicionais que encontram uso na presente invenção incluem metilceluloses (isto é, ésteres de metil celulose). Estes compostos são caracterizados pela seguinte formula estrutural

5



em que R pode ser a hidrogênio ou um grupo metila.

Ésteres de celulose mistos (geralmente referidos como metilceluloses, que contém, além de um teor predominante de grupos metila, também grupos 2-hidroxietila, 2-hidroxipropila ou 2-hidroxibutila) também encontram uso em algumas modalidades da presente invenção. Em algumas modalidades preferidas, hidroxipropil)metilceluloses (por exemplo, METHOCEL® E4M; Dow Química Co.) encontram uso na presente invenção.

Em ainda outras modalidades, carboximetilcelulose de sódio (isto é, sal sódio do éter glicólico de celulose, para o qual R nas fórmulas estruturais acima pode ser hidrogênio e/ou CH_2COONa) encontra uso na presente invenção. Em algumas modalidades preferidas, carboximetilcelulose de sódio, também às vezes referido como "goma de celulose" (por exemplo, NATROSOL® Plus 330 CS; Aqualon) encontra uso na presente invenção.

Em modalidades adicionais, xantano (CAS Nº 11138-66-2), (isto é, goma de xantano), um heteropolissacarídeo geralmente formado por fermentação de açúcar de milho e isolado como sal de potássio encontra uso na presente invenção. Ele é produzido por *Xanthomonas campestris* e algumas outras espécies sob condições aeróbicas e tem um peso molecular de 2×10^6 a 24×10^6 . Xantano é formado a partir de uma cadeia tendo celulose com cadeias laterais. A estrutura dos subgrupos consiste em glicose, manose, ácido glucurônico, acetato e piruvato. O número de unidades de piruvato determina a viscosidade do xantano.

Em ainda outras modalidades, carrageeno é usado como um

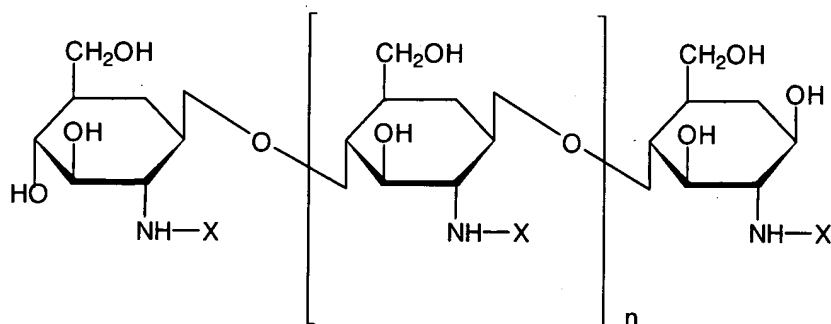
formador de gel em composições da presente invenção. Este composto é um extrato de algas vermelhas do Atlântico Norte (*Florideae*; *Chondrus crispus* e *Gigartina stellata*) que tem uma estrutura similar à de agar. O termo "carrageeno" é freqüentemente usado em referência a um produto de alga em pó e "carrageeno" é usado em referência ao seu extrato. O carrageeno precipitado de um extrato de água quente de algas é um pó incolor a colorido como areia, com um peso molecular na faixa de cerca de 100.000 a cerca de 800.000 e um teor de sulfato de cerca de 25%. Carrageenano, que é muito prontamente solúvel em água quente, forma um gel tixotrópico quando do resfriamento, mesmo se o teor de água for de 95–98%. A rigidez do gel é afetada pela estrutura de hélice dupla do carrageeno.

No caso de carrageenano, três constituintes principais são diferenciados. A "fração κ " formadora de gel consiste em D-galactose 4-sulfato e 3,6-anidro- α -D-galactose, que tem ligações alternadas de glicosídeos na posição 1,3- e 1,4 (em contraste, agar contém 3,6-anidro- α -L-galactose). A "fração λ " não gelificante é composta de radicais D-galactose 2-sulfato 1,3-glicosidicamente ligada e 1,4-ligado D-galactose-2,6-dissulfato, e é prontamente solúvel em água fria. Finalmente, "i-carrageenano", composto de D-galactose 4-sulfato em ligação 1,3 e 3,6-anhidro- α -D-galactose 2-sulfato em ligação 1,4, são ambos solúveis em água e também formadores de gel. A natureza de quaisquer cátions que estão presentes (K^+ , NH_4^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) também influencia a solubilidade do carrageenos.

Em outras modalidades adicionais, quitosano (isto é, quitina parcialmente desacilada) encontra uso em várias composições da presente invenção. Quitosano tem propriedades formadoras de película e é caracterizado como tendo um tato sedoso na pele. Uma desvantagem de alguns uso é sua aderência severa sobre a pele que ocorre temporariamente (geralmente) durante aplicação. Devido a esta aderência, algumas preparações não são aceitáveis pelos consumidores. No entanto, quitosano encontra uso em algumas preparações, incluindo composições de cuidado do cabelo, como é melhor do que quitina em espessamento e/ou estabilização, assim como melhora a adesão e resistência à água de películas poliméricas. O uso de

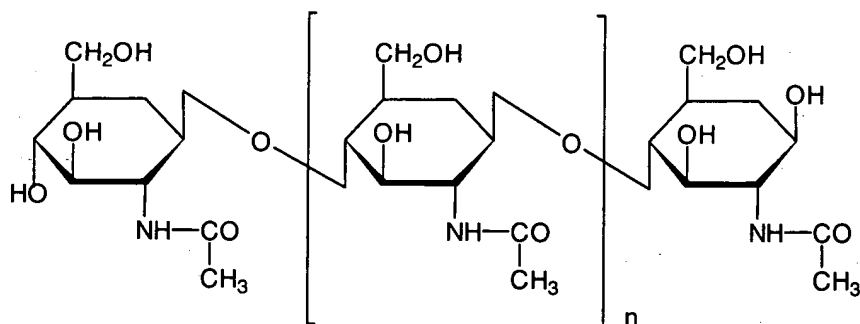
quitosano é bem-conhecido do versado na técnica de cuidado pessoal (Ver por exemplo, Fiedler, Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete, [Lexikon of auxiliaries for pharmacy, cosmetics and related fields], 3^a ed., Edition Cantor, Aulendorf, [1989], p. 293). Quitosano é

5 caracterizado pela seguinte fórmula estrutural :



Onde n assume valores de até cerca de 10 000, e X é ou o radical acetila ou hidrogênio. Quitosano forma por desacetilação e despolimerização parcial (hidrólise) de quitina, que é caracterizada pelo formula estrutural

10



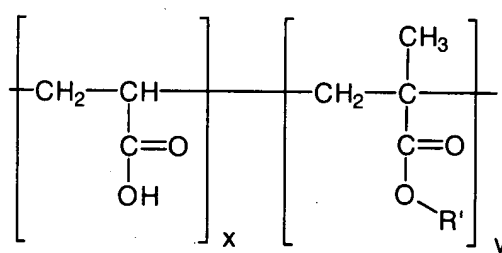
Quitina é um constituinte essencial do ectoesqueleto do artrópode (por exemplo insetos, caranguejos, e aranhas), e é também encontrado nos tecidos conectivos e/ou de suporte de outros organismos (por exemplo moluscos, algas, e fungos). Na região de cerca de pH <6, quitosano é positiva-

15 mente carregado e nesta faixa é também solúvel em sistemas aquosos. Ele é incompatível com matérias-primas aniônicas. Por esta razão, a fim de preparar emulsões óleo-em-água contendo quitosano, o uso de emulsificantes não iônicos é apropriado (Ver por exemplo, EP 776 657). Em algumas modalidades preferidas, as composições da presente invenção contém pelo me-

20 nos um quitosano com um grau de desacetilação de pelo menos cerca de > 25%, e mais preferivelmente, a faixa de mais do que cerca de 55 a cerca de

99% (como determinado por meio de ^1H -RMN). Em algumas modalidades, quitosanos de peso moleculares entre cerca de 10.000 e cerca de 1.000.000, em particular os com peso molecular entre 100.000 e 1.000.000 (determinado por meio de cromatografia de permeação de gel) encontram uso na presente invenção.

Em ainda outras modalidades, poliacrilatos encontram uso como agentes gelificantes em algumas composições da presente invenção. Poliacrilatos apropriados incluem mas não são limitados a copolímeros acrilato-acrilato de alquila, em particular os escolhidos dentre o grupo de carbômeros ou copolímeros CARBOPOL® (B. F. Goodrich Co.). Em particular, os copolímeros acrilato- acrilato de alquila que encontram uso em algumas modalidades da presente invenção tem a seguinte estrutura:



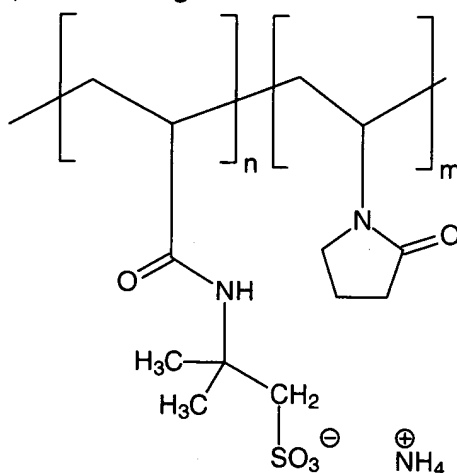
onde R' é um radical alquila de cadeia longa, e x e y representam números que simbolizam a respectiva proporção estequiométrica de cada um dos comonômeros.

Em algumas modalidades, copolímeros de acrilato e/ou copolímeros de acrilato- acrilato de alquila, incluem mas não são limitados aos que são comercialmente disponíveis (por exemplo, CARBOPOL® 1382, CARBOPOL® 981, e CARBOPOL® 5984; B. F. Goodrich Co., e em particular, poliacrilatos do grupo de CARBOPOL tipos 980, 981, 1382, 2984, 5984 e Carbomer 2001). Em modalidades adicionais, copolímeros de acrilatos de C_{10-30} -alquila e um ou mais monômeros de ácido acrílico, de ácido metacrílico ou seus ésteres que são reticulados com um éter alílico de sacarose ou um éter alílico de pentaeritritol encontram uso em algumas modalidades da presente invenção.

Compostos que transportam o nome INCI para "polímeros cruzados de acrilatos/ C_{10-30} alquil acrilato" também encontram uso em algumas

modalidades da presente invenção. Em algumas modalidades, polímeros comercialmente disponíveis (por exemplo, PEMULEN® TR1 e PEMULEN® TR2; B. F. Goodrich Co.) encontram uso em algumas modalidades da presente invenção, apesar não se pretender que a presente invenção seja limitada a qualquer composição contendo acrilato específica.

Em outras modalidades adicionais, compostos que transportam o nome INCI para "copolímeros acriloidimetiltauratos de amônio / vinil pirrolidona" encontram uso na presente invenção. Estes copolímeros acriloidimetiltauratos de amônio / vinil pirrolidona tem a fórmula empírica $[C_7H_{16}N_2SO_4]_n$ $[C_6H_9NO]_m$, que corresponde à seguinte estrutura:



As espécies preferidas deste composto são listadas Chemical Abstracts sob números de registro 58374-69-9, 13162-05-5 e 88-12-0, e são comercialmente disponíveis (por exemplo, ARISTOFLEX®; Clariant GmbH). No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer espécie particular. Em outras modalidades adicionais da presente invenção, copolímeros/polímeros cruzados compreendendo acriloidimetil tau-
rato (por exemplo, SIMUGEL® EG e SIMUGEL® EG; Seppic S.A.) encontram uso em algumas composições da presente invenção.

Hidrocolóides completamente sintéticos adicionais, que encontram uso na presente invenção, incluem, mas não são limitados a poliuretanos aniônicos que são solúveis ou dispersíveis em água e que são com vantagem obteníveis de:

Aa) pelo menos um composto que contém dois ou mais átomos de hidrogênio ativos por molécula,

Ab) pelo menos um diol contendo grupos ácido ou sal, e

Ac) pelo menos um diisocianato.

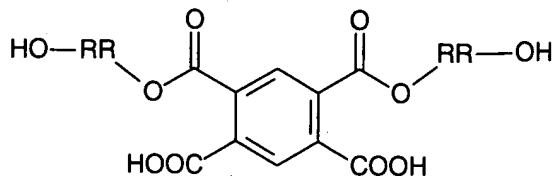
Em algumas modalidades preferidas, o componente Aa) é, em particular, um diol, aminoálcool, diamina, poliesterol, polieterol com a peso molecular médio numérico de, em cada caso, até 3000, ou suas misturas, onde até 3 mol% de referidos compostos podem ser substituídos por trióis ou triaminas. Preferência é dada a dióis e poliesterdióis. Em particular, o componente Aa) compreende pelo menos 50% em peso, com base no peso total da componente Aa), de um poliesterdiol. Poliesterdióis apropriados são todos os que são comumente usados para a preparação de poliuretanos, em particular os produtos de reação of ácido ftálico e dietileno glicol, ácido isoftálico e 1,4-butanodiol, ácido isoftálico / ácido adipico e 1,6-hexanodiol, e ácido adípico e etileno glicol ou 5-NaSO₃- ácido isoftálico, ácido ftálico, ácido adípico e 1,6-hexanodiol.

Exemplos de dióis que encontram uso em algumas modalidades da presente invenção incluem, mas não são limitados a etileno glicol, propileno glicol, butileno glicol, neopentil glicol, polieteróis (por exemplo, polietileno glicóis tendo pesos moleculares de até 3000), copolímeros em bloco de óxido de etileno e óxido de propileno com pesos moleculares médios numéricos de até 3000, e copolímeros em bloco de óxido de etileno, óxido de propileno e óxido de butileno que contém as unidades de óxido de alquilenos copolimerizadas em modo aleatoriamente distribuído ou na forma de blocos. Preferência é dada a etileno glicol, neopentil glicol, di-, tri-, tetra-, penta- ou hexaetileno glicol. Outros dióis que encontram uso incluem poli(ácido α -hidroxicarboxílico) dióis.

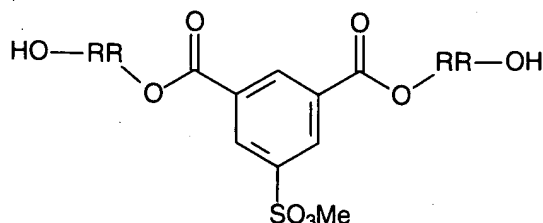
Aminoálcoois apropriados que encontram uso em algumas modalidades da presente invenção incluem mas não são limitados a 2-amino-etanol, 2-(N-metilamino)etanol, 3-aminopropanol, e 4-aminobutanol.

Em algumas modalidades, diaminas como etilenodiamina, propilenodiamina, 1,4-diaminobutano, 1,6-diaminohexano, e α,ω -diaminas que podem ser preparadas por aminação de óxidos de polialquilenos com amônia encontram uso em algumas composições da presente invenção.

Componente Ab) é, em particular, ácido dimetilolpropanóico ou um composto com a fórmula:



e



- 5 onde RR é em cada caso um grupo C₂-C₁₈-alquilenos e Me é Na ou K.

Componente Ac) é, em particular, hexametileno de diisocianato, diisocianato de isoforona, isocianato de metildifenila (MDI), e/ou diisocianato de tolileno.

- Em algumas modalidades, os poliuretanos são obtidos por reação dos compostos de grupos Aa) e Ab) sob atmosfera de gás inerte em um solvente inerte em temperaturas de 70 a 130°C com o composto de grupo Ac). Esta reação pode ser realizada, onde apropriado, na presença de extensores de cadeia a fim de preparar poliuretanos com pesos moleculares relativamente elevados. Como é comum na preparação de poliuretanos, os componentes [(Aa)+(Ab)]:Ac são com vantagem usados na relação molar de 0,8 a 1,1 : 1. O número ácido do poliuretanos é determinado pela composição e a concentração dos compostos de componente (Ab) na mistura de componentes (Aa) e (Ab).

- Em algumas modalidades, os poliuretanos têm valores K de acordo com H. Fikentscher (determinado em soluções a 0,1% em peso de potência em N-metilpirrolidona a 25°C e pH 7) de cerca de 15 a cerca de 100, e preferivelmente cerca de 25 a cerca de 50. O valor K (isto é, "viscosidade intrínseca"), é um parâmetro que é fácil de determinar por meio de viscosidades medidas de soluções de polímero e é assim usado com frequência no setor industrial para a caracterização de polímeros. Poliuretanos con-

tendo grupos ácido que encontram uso em algumas modalidades da presente invenção incluem, mas não são limitados a poliuretanos que são solúveis em água ou dispersíveis sem a ajuda de emulsificantes após neutralização parcial ou completa. Os sais dos poliuretanos geralmente tem melhor solubilidade ou dispersibilidade em água do que os poliuretanos não neutralizados.

5 Bases que encontram uso para a neutralização dos poliuretanos incluem bases de metal alcalino (por exemplo, solução de hidróxido de sódio,, solução de hidróxido de potássio, soda, hidrogenocarbonato de sódio, potássio carbonato ou hidrogeno-carbonato de potássio) e bases de metal alcalino-

10 terroso (por exemplo, hidróxido de cálcio, óxido de cálcio, hidróxido de magnésio ou carbonato de magnésio, e amônia e aminas). Em algumas modalidades, 2-amino-2-metilpropanol, dietilaminopropilamina e triisoproanolamina encontram uso particular na neutralização dos grupos ácidos contendo poliuretanos. Em outras modalidades adicionais, a neutralização dos poliuretanos

15 contendo grupos ácidos é realizada usando misturas de duas ou mais bases (por exemplo misturas de solução de hidróxido de sódio e triisopropanolamina). Dependendo do uso pretendido, a neutralização é parcial (por exemplo cerca de 20 a cerca de 40%) ou completa (isto é, 100%). Estes polímeros e sua preparação são descritos em maiores detalhes em DE-A-42 25 045, in-

20 corporado aqui por referência.

B. Poliuretanos e poliuréias catiônicos solúveis ou dispersíveis em água:

Ba) pelo menos um diisocianato, que já pode ter sido reagido antes com um ou mais compostos que contém dois ou mais átomos de hidrogênio ativo por molécula, e

25

Bb) pelo menos um diol, amino álcool primário ou secundário, diamina primária ou secundária ou triamina primária ou secundária com um ou mais átomos de amino nitrogênio terciários, quaternários ou protonados terciários.

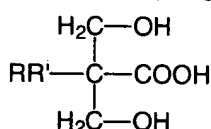
30 Preferidos diisocianatos são os dada acima sob A). Compostos com dois ou mais átomos de hidrogênio ativos são dióis, aminoálcoois, diaminas, poliesteróis, poliamidadiaminas e polieteróis. Compostos apropriados

deste tipo são os dados acima sob A).

Os poliuretanos são preparados como descrito acima sob A). Grupos catiônicos carregados pode ser produzidos nas poliuréis a partir dos átomos de amino nitrogênio terciários presentes ou por protonação, (por exemplo, com ácidos carboxílicos como ácido láctico), ou por quaternização (por exemplo com agentes alquilantes como halogenetos de C₁ a C₄-alquila) ou sulfatos. Exemplos destes agentes alquilantes incluem, mas não são limitados a cloreto de etila, brometo de etila, cloreto de metila, brometo de metila, sulfato de dimetila e sulfato de dietila. Estes polímeros e sua preparação são descritos em maiores detalhes em DE-A-42 41 118, que é incorporado aqui por referência.

C. Poliuretanos lineares com grupos carboxilato de

Ca) um ácido 2,2-hidroximetil-substituído carboxílico da fórmula



em que RR' é um átomo de hidrogênio ou um grupo C₁-C₂₀-alquila, que é usado em uma quantidade que é suficiente para cerca de 0,35 a cerca de 2,25 miliequivalentes de grupos carboxila para estar presente nos poliuretanos por g de poliuretano,

Cb) cerca de 10 a cerca de 90% em peso, com base no peso do poliuretano, de um ou mais compostos orgânicos com não mais do que dois átomos de hidrogênio ativos e

Cc) um ou mais diisocianatos orgânicos.

Em algumas modalidades preferidas, os grupos carboxila presentes no poliuretano são, finalmente, pelo menos parcialmente neutralizados com uma base apropriada. Estes polímeros e sua preparação são descritos em EP-A-619 111, incorporado aqui por referência.

D. Produtos de policondensação contendo carboxila de anidridos de ácidos tri- ou tetracarboxílicos e dióis, diaminas ou aminoálcoois (poliésteres, poliamidas ou poliéster amidas). Estes polímeros e sua preparação são descritos em maiores detalhes em DE-A-42 24 761, incorporado aqui por referência.

E. Poliacrilatos e polimetacrilatos, como são descritos em maiores detalhes em DE-A-43 14 305, 36 27 970 e 29 17 504, todos sendo incorporados aqui por referência.

Os polímeros usados em algumas modalidades da presente invenção tem um valor K de cerca de 15 a cerca de 100, e mais preferivelmente de cerca de 25 a cerca de 50. Os polímeros estão geralmente presentes na composição em uma quantidade na faixa de cerca de 0,2 a cerca de 20% em peso, com base no peso total das composições. O sal é usado em uma quantidade efetiva para melhorar a capacidade de troca dos polímeros. O sal é geralmente usado em uma quantidade de cerca de 0,02 a cerca de 10% em peso, e mais preferivelmente de cerca de 0,05 a cerca de 5% em peso, e em particular, de cerca de 0,1 a cerca de 3% em peso, com base no peso total da composição.

A quantidade total de um ou mais hidrocolóides em algumas modalidades das composições de cuidado pessoal da presente invenção é menor do que cerca de 5% em peso, preferivelmente entre cerca de 0,05 e cerca de 3,0% em peso, e mais preferivelmente entre cerca de 0,1 e cerca de 1,0% em peso, com base no peso total da preparações.

Em algumas modalidades adicionais, agentes interface- e/ou tensoativos são incluídos em algumas composições de cuidado pessoal da presente invenção, incluindo mas não limitadas a emulsificantes catiônicos (por exemplo, tensoativos quaternário).

Tensoativos quaternários que contém pelo menos um átomo N que é covalentemente ligado a 4 grupos alquila ou arila. Isto leva, em levar em conta o pH, a uma carga positiva. Alquilbetaína, alquilamidopropilbetaína e alquilamidopropilhidroxissultaína são exemplos de tensoativos quaternários que encontram uso em algumas modalidades da presente invenção.

Os tensoativos catiônicos providos em algumas modalidades da presente invenção também incluem, mas não são limitados a compostos de amônio quaternário, em particular cloretos ou brometos de benziltrialquilamônio (por exemplo, cloreto de benzildimetilestearil amônio), sais de alquiltrialquilamônio (por exemplo, cloreto ou brometo de cetiltrimetilamônio), clo-

retos ou brometos de alquildimetilhidroxietilamônio, cloretos ou brometos de dialquildimetilamônio, sulfatos de éter de alquilamidoetiltrimetilamônio, sais de alquil piridínio (por exemplo, cloreto de lauril- ou cetilpirimidínio), derivados de imidazolina, e compostos com um caráter catiônico, como óxidos de amina (por exemplo, óxidos de alquildimetilamina ou óxidos de alquilaminoe-

5 tildimetilamina). Em algumas modalidades preferidas, sais de cetiltrimetilamônio encontram uso em algumas composições de cuidado pessoal da presente invenção.

Em outras modalidades adicionais, polímeros catiônicos (por exemplo, JAGUAR® C 162 [cloreto de hidroxipropil guar hidroxipropiltrimônio]), silicatos de alumínio magnésio modificados (por exemplo, quaternium-18-hectorita, que é comercialmente disponível (por exemplo, BENTONE® 38; Rheox), e/ou hectorita de estearalcônio, que é comercialmente disponível (por exemplo, gel SOFTISAN®; Hüls AG) encontram uso em algumas

15 composições de cuidado pessoal da presente invenção. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer particular polímero catiônico.

Em ainda outras modalidades, algumas composições da presente invenção compreendem espessantes de óleo a fim de melhorar as propriedades táteis de emulsões. Espessantes de óleos preferidos incluem, mas não são limitados a outros sólidos (por exemplo, óxidos de silício hidrofóbicos do tipo AEROSIL®, que são disponíveis de Degussa AG). Exemplos de tipos de óxidos AEROSIL® vantajosos incluem AEROSIL® OX50, AEROSIL® 130, AEROSIL® 150, AEROSIL® 200, AEROSIL® 300, AEROSIL® 380, AEROSIL® MOX 80, AEROSIL® MOX 170, AEROSIL® COK 84, AEROSIL® R 202, AEROSIL® R 805, AEROSIL® R 812, AEROSIL® R 972, AEROSIL® □ R 974 e AEROSIL® R976.

25

Em algumas modalidades adicionais, algumas composições de cuidado pessoal da presente invenção compreendem pelo menos um "sabão de metal" (isto é um sal de um ácido graxo superior, com a exceção do sal de metal alcalino), que funcionam como espessantes de óleos. Exemplos destes sabões de metal incluem, mas não são limitados a estearato de alu-

30

mínio, estearato de zinco e/ou estearato de magnésio.

Em algumas outras modalidades, algumas composições de cuidado pessoal compreendem pelo menos um tensoativo anfotérico e/ou zwitteriônico (por exemplo, cocamidopropilbetaína) e/ou umectante (por exemplo betaína). Exemplos de tensoativos anfotéricos que encontram uso em tais modalidades da presente invenção incluem mas não são limitados a acil/dialquiletilenodiamina (por exemplo, acilanfoacetato de sódio), acilanfodipropionato de dissódio, alquilanfodiacetato de dissódio, acilanfohidroxipropil-sulfonato de sódio, acilanfodiacetato de dissódio, acilanfopropionato de sódio, N-alquilaminoácidos, por exemplo aminopropilalquilglutamida, ácido alquilaminopropiônico, alquilimidodipropionato de sódio, e lauroanfocarboxiglicinato.

Em algumas modalidades, a quantidade substâncias de interface ou tensoativas (um ou mais compostos) nas preparações está preferivelmente entre cerca de 0,001 e cerca de 30% em peso, e mais preferivelmente entre cerca de 0,05 e cerca de 20% em peso, o mais preferivelmente entre cerca de 1 e cerca de 10% em peso, com base no peso total da preparação.

Em algumas outras modalidades adicionais, os ingredientes ativos (um ou mais compostos) compreendem pelo menos um ingrediente ativo lipofílico. Em algumas modalidades, estes ingredientes ativos lipofílicos são selecionados dentre o grupo consistindo em ácido acetil salicílico, atropina, azuleno, hidrocortisona e seus derivados (por exemplo, hidrocortisona-17-valerato), B vitaminas, vitaminas D, vitamina B₁, vitamina B₁₂, vitamina D₁, retinóide, bisabolol, ácidos graxos insaturados (por exemplo ácidos graxos essenciais, com frequência também referido como "vitamina F"), ácido γ-linolênico, ácido oléico, ácido eicosapentenóico, ácido docosahexenóico e seus derivados, cloranfenicol, cafeína, prostaglandinas, timol, cânfora, extratos ou outros produtos de uma origem vegetal e animal (por exemplo óleo de primula da primavera, óleo de borragem ou semente de passa de corinto, óleos de peixe e óleo de fígado de bacalhau), e ceramidas e compostos similares a ceramida, etc. Em algumas modalidades, os ingrediente(s) ativo(s) são substâncias sobre-engordurantes (por exemplo, óleo de purcelina, EU-

CERIT® e/ou NEROCERIT®).

Em ainda algumas outras modalidades, o(s) ingrediente(s) ativo(s) compreendem inibidores de NO sintase. Estas modalidades encontram uso particular em tratamento e/ou profilaxia dos sinais e sintomas associados com o envelhecimento da pele intrínseco e/ou extrínseco, assim como para o tratamento e/ou profilaxia associados com os efeitos nocivos de radiação ultravioleta sobre a pele. Em algumas modalidades preferidas, o inibidor de NO sintase é nitroarginina.

Em ainda algumas modalidades adicionais, o(s) ingrediente(s) ativo (s) é/são catequinas, ésteres de biles de catequinas, e/ou extratos aquosos ou orgânicos de plantas ou seções de plantas que tem um teor de catequinas ou ésteres de bile de catequinas (por exemplo, as folhas da família da planta *Theaceae*, em particular da espécie *Camellia sinensis* [chá verde]). Seus ingredientes típicos (por exemplo, polifenóis ou catequinas, cafeína, vitaminas, açúcares, minerais, aminoácidos, lipídeos) encontram uso particular em algumas modalidades da presente invenção.

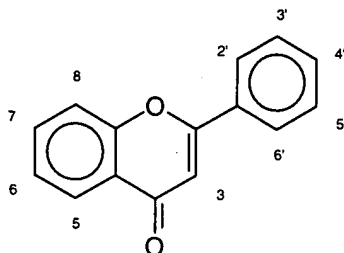
Em algumas modalidades, catequinas encontram uso na presente invenção. Catequinas são um grupo de compostos que são considerados como flavonas hidrogenadas ou antocianidinas, e são derivadas de "catequina" (catecol, 3,3',4',5,7-flavanpentol, 2-(3,4-dihidroxifenil)croman-3,5,7-triol). Epicatequina ((2R,3R)-3,3',4',5,7-flavanpentol) é também um ingrediente ativo que encontra uso em algumas modalidades da presente invenção.

Em outras modalidades adicionais, extratos de plantas com um teor de catequina, em particular extratos de chá verde (por exemplo, extratos de folhas da planta do gênero *Camellia*, em particular os usados para chá como *C. sinensis*, *C. assamica*, *C. taliensis*, e *C. irrawadiensis* e híbridos destas espécies com outras espécies, como *C. japonica*) encontram uso em algumas composições de cuidado pessoal da presente invenção.

Em ainda outras modalidades, ingredientes ativos preferidos incluem polifenóis e catequinas do grupo (-)-catequina, (+)-catequina, galato de (-)-catequina, galato de (-)-galocatequina, (+)-epicatequina, (-)-epicatequina, galato de (-)-epicatequina, (-)-epigalocatequina, e galato de (-)-epigaloca-

tequina.

Em algumas modalidades adicionais das composições da presente invenção flavona e seus derivados (também com freqüência coletivamente chamados "flavonas") encontram uso. Estes compostos tem a seguinte estrutura básica (posições de substituição são mostradas):

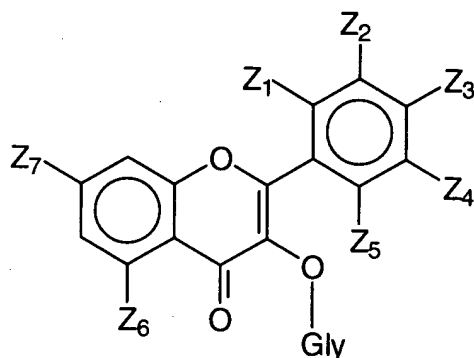


Algumas das flavonas mais importantes que encontram uso em algumas composições de cuidado pessoal da presente invenção são providas abaixo. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer flavona particular.

FLAVONAS								
	Posições de Substituição de OH							
	3	5	7	8	2'	3'	4'	5'
Flavona	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonol	+	-	-	-	-	-	-	-
Crisina	-	+	+	-	-	-	-	-
Galangina	+	+	+	-	-	-	-	-
Apigenina	-	+	+	-	-	-	+	-
Fisetina	+	-	+	-	-	+	+	-
Luteolina	-	+	+	-	-	+	+	-
Kaempferol	+	+	+	-	-	-	+	-
Quercetina	+	+	+	-	-	+	+	-
Morina	+	+	+	-	+	-	+	-
Robinetina	+	-	+	-	-	+	+	+
Gossipetina	+	+	+	+	-	+	+	-
Miricetina	+	+	+	-	-	+	+	+

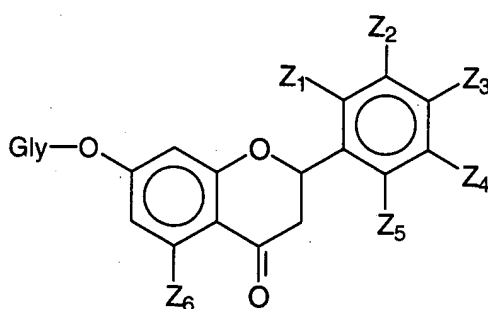
glicosilada.

Em ainda outras modalidades, as composições de cuidado pessoal da presente invenção compreendem pelo menos um flavonóide tendo fórmula estrutural genérica:



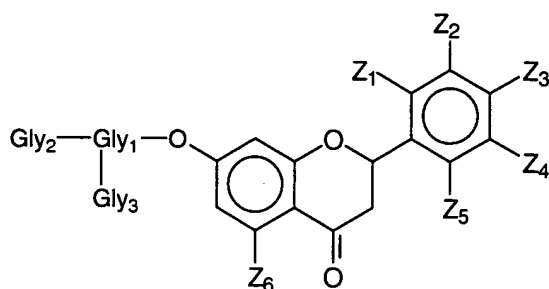
- 5 onde Z_1 a Z_7 , independentemente um do outro, são escolhidos dentre o grupo consistindo em H, OH, alcóxi e hidroxialcóxi, onde os grupos alcóxi e hidroxialcóxi podem ser ramificados ou não ramificados e tem 1 a 18 átomos de carbono, e onde Gly é escolhido dentre o grupo de radicais mono- e oligoglicosídeos.

- 10 Em algumas modalidades alternativas, as composições de cuidado pessoal da presente invenção compreendem pelo menos um flavonóide tendo a fórmula estrutural genérica:



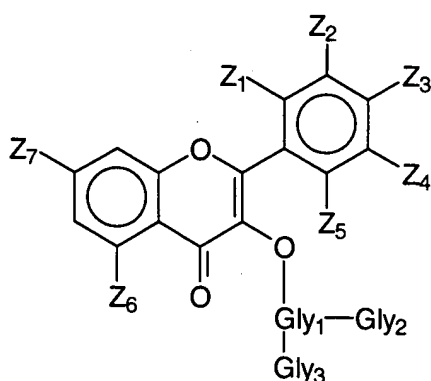
- 15 onde Z_1 a Z_6 , independentemente um do outro, são escolhidos dentre o grupo consistindo em H, OH, alcóxi e hidroxialcóxi, onde os grupos alcóxi e hidroxialcóxi podem ser ramificados ou não ramificados e tem 1 a 18 átomos de carbono, onde Gly é escolhido dentre o grupo de radicais mono e oligoglicosídeos.

- 20 Em algumas modalidades preferidas, a composição tem a fórmula estrutural genérica

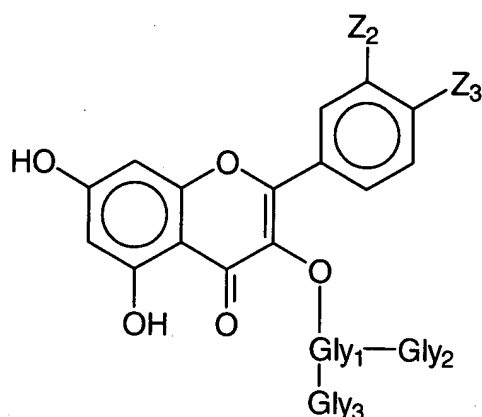


onde Gly₁, Gly₂ e Gly₃, independentemente um do outro, são radicais monoglicosídeos. Gly₂ e Gly₃ também podem, individualmente ou juntos, representar saturações por átomos de hidrogênio. Em algumas modalidades preferidas, Gly₁, Gly₂ e Gly₃, independentemente um do outro, são selecionados dentre o grupo de radicais hexosila, em particular os radicais rhamnosila e radicais glucosila. No entanto, radicais hexosila, por exemplo alosila, altrosila, galactosila, gulosila, idosila, mannosila e talosila, também encontram uso em algumas modalidades da presente invenção. Em outras modalidades adicionais, radicais pentosila encontram uso em algumas composições de cuidado pessoal da presente invenção.

Em algumas modalidades, Z₁ a Z₅ são, independentemente um do outro, escolhidos com vantagem dentre o grupo consistindo em H, OH, metóxi, etóxi e 2-hidroxietóxi, e os glicosídeos de flavona tem a estrutura:



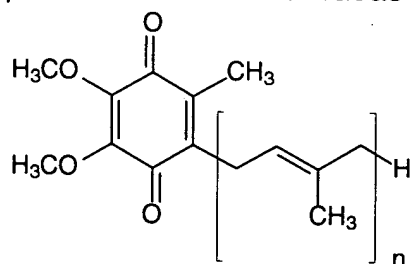
Em algumas modalidades, os glicosídeos de flavona providos em algumas das composições de cuidado pessoal da presente invenção tem a seguinte estrutura:



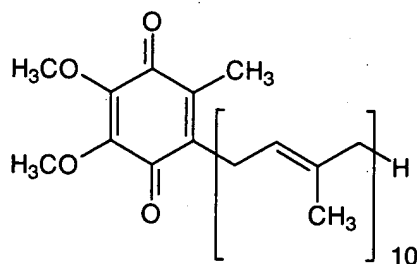
onde Gly₁, Gly₂ e Gly₃, independentemente um do outro, são radicais monoglicosídeos. Gly₂ e Gly₃ também podem, individualmente ou juntos, representar saturações por átomos de hidrogênio. Em modalidades alternativas, Gly₁, Gly₂ e Gly₃, independentemente um do outro, são selecionados dentre o grupo de radicais hexosila, em particular de radicais rhamnosila e radicais glucosila. No entanto, outros radicais hexosila, por exemplo alosila, altrosila, galactosila, gulosila, idosila, mannosila e talosila, encontram uso em algumas modalidades da presente invenção. Além disso, em algumas modalidades, radicais pentosila encontram uso na presente invenção. Em algumas modalidades preferidas, as composições de cuidado pessoal da presente invenção compreendem um ou mais glucosídeos de flavona selecionados dentre o grupo consistindo em a-glucosilrutina, a-glucosilmiricetina, a-glucosilisoquercitrina, a-glucosilisoquercetina e a-glucosilquercitrina. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o glucosídeo de flavona é a-glucosilrutina.

Em ainda algumas modalidades adicionais, as composições de cuidado pessoal da presente invenção compreendem pelo menos uma naringina (por exemplo, aurantina, naringenin-7-rhamno-glucosídeo), hesperidin 3',5,7-trihidróxi-4'-metoxiflavanona-7-rutinosídeo, hesperidosídeo, hesperetin-7-O-rutinosídeo), rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona-3-rutinosídeo, quercetina-3-rutinosídeo, soforina, birutana, rutabion, taurutina, fitomelina, melina), troxerutina (3,5-dihidróxi-3',4',7-tris(2-hidroxietóxi)flavona-3-(6-O-(6-deóxi-a-L-mannopiranosil)-b-D-glucopiranosídeo)), monoxerutina (3,3',4',5-tetrahidróxi-7-(2-hidroxietóxi)flavona-3-(6-O-(6-deóxi-a-L-mannopiranosil)-b-

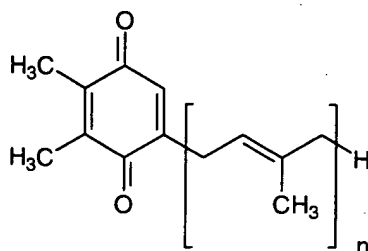
D-glucopiranosídeo)), dihidrorobinetina (3,3',4',5',7-pentahidroxiflavanona), taxifolina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavanona), eriodictiol-7-glucosídeo (3',4',5,7-tetrahidroxiflavanona-7 glucosídeo), flavanomareína (3',4',7,8-tetrahidroxiflavanona-7 glucosídeo), e/ou isoquercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavanona-3-(b-D-glucopiranosídeo). Em ainda algumas outras modalidades, o ingrediente ativo é selecionado dentre o grupo consistindo em ubiquinonas e plastoquinonas. Ubiquinonas são caracterizadas pela fórmula estrutural:



Ubiquinonas são as bioquinonas mais difundidas e as mais investigadas. Ubiquinonas são referidas como, dependendo do número de unidades de isopreno ligadas nas cadeias laterais, como Q-1, Q-2, Q-3 etc., ou de acordo com o número de átomos de carbono, como U-5, U-10, U-15 etc. Elas preferivelmente surgem com alguns comprimentos de cadeia (por exemplo em alguns microorganismos e leveduras onde $n=6$). Na maior parte dos mamíferos, incluindo seres humanos, Q10 predomina. Coenzima Q10 encontra uso particular em algumas modalidades da presente invenção. Sua fórmula estrutural é:

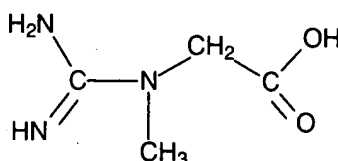


Plastoquinonas tem a fórmula estrutural geral:



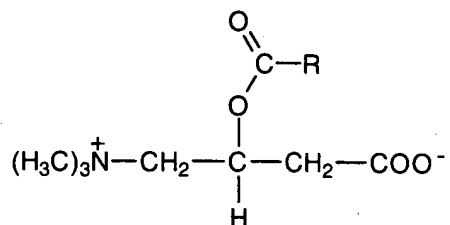
Plastoquinonas diferem nos números n de radicais isoprenos e são referidas assim (por exemplo PQ-9 [n=9]). Além disso, outras plastoquinonas com variados substituintes no anel quinona existem em algumas modalidades.

- 5 Em ainda algumas outras modalidades, a presente invenção compreende pelo menos uma creatina e/ou derivado de creatina. Creatina tem a seguinte estrutura:



- 10 Em algumas modalidades preferidas das composições de cuidado pessoal da presente invenção, fosfato de creatina, sulfato de creatina, acetato de creatina, ascorbato de creatina, e/ou derivados esterificados ao grupo carboxila com álcoois mono- ou polifuncionais encontram uso.

Em algumas formas adicionais de realização, as composições de cuidado pessoal da presente invenção contém L-carnitina [3-hidróxi-4-(trimetilamônio)butirobetáína e]. Acilcarnitinas tem a seguinte estrutura geral:



- 15 onde R é escolhido dentre o grupo de radicais alquila ramificados e não ramificados tendo até 10 átomos de carbono, e encontram uso em algumas modalidades da presente invenção. Em algumas modalidades preferidas, propionilcarnitina e/ou acetilcarnitina encontram uso. Ambos os enantiômeros (forma D e L), assim como misturas e racematos das formas D- e L- en-
20 contram uso em algumas composições de cuidado pessoal da presente invenção.

Em algumas outras modalidades, os ingredientes ativos da presente invenção incluem, mas não são limitados a sericosídeo, piridoxol, vitamina K, biotina, e substâncias aromáticas. Além disso, não se pretende que

os ingredientes ativos presentes nas composições de cuidado pessoal da presente invenção sejam limitados a qualquer constituinte e/ou mistura(s) de ativos em particular. De fato, pretende-se que várias ativos e misturas de ativos encontrem uso em várias modalidades da presente invenção. Também não se pretende que a(s) concentração(s) de tais ativos seja(m) limitada(s) a qualquer nível em particular. Em algumas modalidades, a concentração vai de cerca de 0,001 a cerca de 30% em peso, enquanto em outras modalidades, é de cerca de 0,05 a cerca de 20% em peso, e ainda em outras modalidades, de cerca de 0,1 a cerca de 10% em peso, com base no peso total da preparação. É ainda contemplado que os versados na técnica irão formular composições de cuidado pessoal da presente invenção com concentração (ões) ativa(s) que é (são) apropriada(s) para o uso pretendido das composições.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção provê peptídeos e peptídeos suportados para tratar várias doenças e condições. Em modalidades particularmente preferidas, a presente invenção provê composições e métodos de cuidado pessoal. Em algumas modalidades, a presente invenção provê composições para uso em cuidado da pele e/ou do cabelo, assim como composições cosméticas. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, a presente invenção provê peptídeos e peptídeos suportados para tratar doenças da pele, como rosácea. Em algumas modalidades particularmente preferidas, os peptídeos suportados da presente invenção são peptídeos anti-VEGF. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, os peptídeos anti-VEGF são expressados em uma proteína do esqueleto. Em algumas modalidades mais preferidas, a proteína do esqueleto compreende BBI.

Em algumas modalidades preferidas, a presente invenção provê compostos cosméticos e/ou farmacêuticos apropriados para melhorar a aparência da pele. A presente invenção ainda provê peptídeos que bloqueiam a ligação de uma proteína. Em algumas modalidades preferidas, a proteína é VEGF. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o peptídeo é expressado em um esqueleto resistente a protease. Em algumas modalida-

des especialmente preferidas, o esqueleto é um inibidor de protease (por exemplo, BBI, STI, ou inibidor de quimotripsina Elgin). Em algumas modalidades mais preferidas, o inibidor de protease é um BBI que foi funcionalmente e/ou estruturalmente modificado.

- 5 Como indicado acima, dois inibidores de proteína protease foram isolados de soja, o inibidor de tripsina de tipo Kunitz (inibidor de tripsina de soja, STI) e o inibidor de protease Bowman-Birk (BBI) (Ver por exemplo, Birk, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 25:113-131 [1985]; e Kennedy, *Am. J. Clin. Neutr.*, 68:1406S-1412S [1998]). Estes inibidores servem como um esqueleto
- 10 tode começo para as seqüências variantes como aqui provido para produzir o inibidor de protease em combinação com pelo menos uma seqüência de peptídeos que foi modificada e/ou substituída em uma seqüência (por exemplo, BBI-AV ou STI-AV). Além das alterações nos suportes "scaffold" compreendendo as seqüências variantes, outras proteínas desejadas, como u-
- 15 sado aqui, incluem a adição de seis resíduos de histidina ao C-término (vide, Figuras 1 e 2).

Inibidor de tripsina de soja (STI)

- STI inibe a atividade proteolítica de tripsina pela formação de um complexo estequiométrico estável (Ver por exemplo, Liu, *Chemistry and Nutritional Value of Soybean Components*, *em: Soybeans, Chemistry, Technology and Utilization*, pp. 32-35, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Md., [1999]). STI consiste em 181 resíduos de aminoácidos com duas pontes dissulfeto, tendo uma forma grosseiramente esférica (Ver por exemplo, Song *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 275:347-63 [1998]). O laço inibidor de tripsina se encontra
- 20 dentro da primeira ponte dissulfeto. O inibidor de tripsina de soja de tipo Kunitz (STI) desempenhou um papel chave nos estudos anteriores de proteinases, tendo sido usado como o substrato principal no trabalho bioquímico e cinético que leve à definição do mecanismo padrão de ação de inibidores de
- 25 proteinase.

30 Inibidor de Bowman-Birk (BBI)

Proteínas inibidoras de Bowman-Birk são uma família cineticamente e estruturalmente bem caracterizada de proteínas pequenas (60-90

resíduos) isoladas de sementes de leguminosas, assim como outras plantas, incluindo várias gramíneas. Elas tipicamente têm uma estrutura simétrica de dois domínios tricíclicos cada contendo um laço de ligação independente, apesar de algumas terem um domínio e algumas tem mais do que dois domínios. O inibidor de Bowman-Birk principal de ~ 8 kDa isolado de soja (BBI) tem dois laços de sítios reativos separados, laço I inibe proteases tendo especificidade similar a tripsina e laço II inibe proteases com especificidade similar a quimotripsina (Ver por exemplo, Chen *et al.*, J. Biol. Chem., 267:1990-1994 [1992]; Werner e Wemmer, Biochem., 31:999-1010 [1992]; Lin *et al.*, Eur. J. Biochem., 212:549-555 [1993]; Voss *et al.*, Eur. J. Biochem., 242:122-131 [1996]; e Billings *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 89:3120-3124 [1992]). Estas regiões de ligação contém, cada, uma estrutura de "laço canônico", que é um motivo encontrado em vários inibidores de serina proteinase (Bode e Huber, Eur. J. Biochem., 204:433-451 [1992]). STI e BBI são encontrados somente na semente de soja, e não em qualquer outra parte da planta (vide, por exemplo, Birk, Int. J. Pept. Protein Res., 25:113-131 [1985]).

Apesar de numerosas isoformas de BBI terem sido caracterizadas, SEQ ID NO:47 mostra uma seqüência de aminoácidos da estrutura dorsal de BBI usada em alguns experimentos, como aqui descrito, compreendendo aproximadamente 71 resíduos de aminoácidos (Ver Exemplo 16).

Em soja, BBI é produzido como uma pró-proteína com um propeptídeo N-terminal que tem 19 aminoácidos de comprimento. Assim, em algumas modalidades, BBI é produzido com todas ou pelo menos uma porção do propeptídeo. Em algumas modalidades, BBI é truncado, com o número de 10 resíduos de aminoácidos sendo removidos do N- ou do C- terminal. Por exemplo, quando da dessecação da semente, algumas moléculas de BBI tem os 9 ou 10 resíduos de aminoácidos C-terminais removidos. Assim, proteólise é geralmente altamente tolerada antes do dissulfeto inicial e logo após a ligação de dissulfeto terminal, cujas consequências geralmente não são prejudiciais para a ligação à proteína-alvo. No entanto, será notado que qualquer uma das isoformas ou formas truncadas encontram uso em várias modalidades da presente invenção.

Variantes do inibidor de protease

Como indicados acima, os inibidores STI e BBI de protease tem laços de ligação que inibem as proteases. A presente invenção provê variantes de inibidor de protease com alterações em um ou mais sítios reativos (por exemplo, Laço I e/ou Laço II de BBI). Em algumas modalidades preferidas, os laços são substituídos com seqüências que interagem com a proteína alvo.

Por exemplo, em algumas modalidades, os laços são substituídos com seqüências derivadas de proteínas de ligação de VEGF, inibidores da via complementar como inibidores C2, C3, C4 ou C5, Compstatin, citocinas, outras proteínas de interesse, etc. De fato, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer seqüência particular substituída em qualquer um destes laços, pois qualquer seqüência apropriada encontra uso na presente invenção.

Em algumas modalidades, seqüências variantes são selecionadas por vários métodos conhecidos na técnica, incluindo mas não limitadas a apresentação na superfície de fagos outros métodos de triagem apropriado. Por exemplo, uma bibliotecas de genes de peptídeos aleatória é fundida com o gene de fago PIII de modo que a biblioteca do peptídeo será apresentada na superfície do fago. Subseqüentemente, a biblioteca de apresentação na superfície de fagos é exposta à proteína alvo e lavada com tampão para remover a ligação não específica (este processo é às vezes referido como "bateia"). Finalmente, o fago de ligação e PCR da seqüência de DNA para o peptídeo codificado são isolados.

Na maior parte das modalidades, um dos laços é substituído com a seqüência variante (isto é, peptídeos; com frequência 3 a 14 aminoácidos em comprimento, com 5 a 10 aminoácidos sendo preferidos). Seqüências mais longas encontram uso na presente invenção, desde que proporcionem a ligação e/ou inibição desejada. Além disso, peptídeos apropriados para uso como substituições de um laço(s) de ligação preferivelmente adotam uma conformação funcional quando contidos dentro de um laço confinado (isto é, um laço formado pela presença de uma ligação de dissulfeto entre

dois resíduos de cisteína). Em algumas modalidades específicas, os peptídeos tem entre 7 e 9 aminoácidos de comprimento. Estas seqüências de substituição também proporcionam inibição de protease ou ligação às proteínas marcadas. Em algumas modalidades, obtém-se vantagens na alteração de um único aminoácido.

Proteínas de Fusão

Em modalidades preferidas, cada inibidor de protease ou sua variante é expressado como uma proteína de fusão pela célula hospedeira bacteriana. Apesar da clivagem do polipeptídeo de fusão para liberar a proteína desejada ser utilizável com freqüência, ela não é necessária. Os inibidores de protease e suas variantes expressados e secretados como proteínas de fusão retém, de modo surpreendente, sua função.

As seqüências de DNA acima definidas codificando as seqüências de aminoácidos correspondentes são combinadas para formar uma "seqüência de DNA de fusão." Estas seqüências de DNA de fusão são montadas em matriz de leitura aberta apropriada a partir do 5' término a 3' término na ordem de primeira, segunda, terceira e quarta seqüências de DNA. Como assim montada, a seqüência de DNA codifica um "polipeptídeo de fusão" codificando a partir do seu amino-término um peptídeo de sinal funcional como uma seqüência secretória em espécies bacterianas, um polipeptídeo secretado ou porção do mesmo, normalmente secretados de uma espécie bacteriana, um peptídeo ligante clivável e um polipeptídeo desejado (por exemplo, um inibidor de protease e suas variantes). Vários métodos são conhecidos dos versados para o produção de proteínas de fusão (Ver por exemplo, Patentes US 5.411.873, 5.429.950, e 5.679.543, todas sendo incorporadas aqui por referência). Assim, pretende-se que quaisquer métodos apropriados irão encontrar uso na presente invenção.

Expressão de Inibidores de Protease Recombinantes

Na extensão que a presente invenção depende da produção de proteínas de fusão, ela se baseia em técnicas de rotina no campo de genética recombinante. Os textos básicos descrevendo os métodos gerais de uso nesta invenção incluem Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory*

Manual ((2nd ed.) [1989]); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); e Ausubel *et al.*, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (1994).

5 A presente invenção provê células hospedeiras bacterianas que foram transduzidas, transformadas ou transfectadas com um vetor de expressão compreendendo uma seqüência de ácido nucléico codificando inibidor de protease. As condições de cultura, como temperatura, pH e outros, são as previamente usadas para a célula hospedeira parental antes da transdução, transformação ou transfeção que são evidentes para os versa-

10 dos na técnica.

Basicamente, a seqüência nucleotídica codificando uma proteína de fusão é ligada operativamente a uma seqüência de promotor funcional na célula hospedeira. Esta unidade de promotor-gene é então tipicamente clonada em vetores intermediários antes da transformação nas células hos-

15 pedeiras por replicação e/ou expressão. Estes vetores intermediários são tipicamente vetores procarióticos (por exemplo, plasmídeos, ou vetores *shuttle*). No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada ao uso de vetores intermediários, como esta etapa é omitida em algumas modalidades preferidas.

20 Em uma abordagem, uma cultura bacteriana é transformada com um vetor de expressão tendo um promotor ou fragmento de promotor biologicamente ativo ou um ou mais (por exemplo, uma séries) de melhoradores que funcionam na célula hospedeira, ligada operativamente a uma seqüência de ácido nucléico codificando um inibidor de protease, de modo

25 que a protease é expressada na célula. Em algumas modalidades preferidas, as seqüências de DNA codificam um inibidor de protease ou suas variantes. Em outra modalidade preferida, o promotor é um regulável.

Constructos de Ácido nucléico /Vetores de expressão.

Fragmentos de polinucleotídeos naturais ou sintéticos codificando um inibidor de protease (isto é, "seqüências de ácido nucléico codificando PI ") podem ser incorporados em constructos de ácido nucléico heterólogas

30 ou vetores, capazes de introdução, e replicação em uma célula bacteriana.

Os vetores e métodos descritos aqui são apropriados para uso em várias células hospedeiras para a expressão de inibidores de protease e suas variantes. Qualquer vetor pode ser usado desde que ele seja replicável e viável nas células em que ele é introduzido. Números elevados de vetores e promotores apropriados são conhecidos do versado e são comercialmente disponíveis. Vetores de clonagem e de expressão apropriados são também descritos em várias referências conhecidas dos versados (Ver por exemplo, Sambrook *et al.*, *supra* e Ausubel *et al.*, *supra*, expressamente incorporados por referência aqui). A seqüência de DNA apropriada é inserida em um plasmídeo ou vetor (coletivamente referido aqui como "vetores") por qualquer método apropriado. Geralmente, a seqüência de DNA é inserida em sítio(s) de endonuclease de restrição por procedimentos padrões conhecidos dos versados.

Vetores apropriados são tipicamente equipados com uma seqüência de ácido nucléico codificando um marcador selecionável, sítios de inserção, e elementos de controle apropriados, como seqüências de terminação. Em algumas modalidades, os vetores compreendem seqüências regulatórias, incluindo, por exemplo, elementos de controle (isto é, elementos de promotor e terminador ou regiões não traduzidas 5' e/ou 3'), eficazes para a expressão da seqüência de codificação em células hospedeiras (e/ou em um meio de vetor ou célula hospedeira em que uma seqüência de codificação de proteína solúvel modificada não é normalmente expressada), ligadas operativamente à seqüência de codificação. Números elevados de vetores e promotores apropriados são conhecidos do versado, muitos destes sendo comercialmente disponíveis e conhecidos dos versados.

Promotores exemplares incluem tanto promotores constitutivos como promotores indutíveis. Estes promotores são bem-conhecidos dos versados na técnica. Os versados na técnica também sabem que um promotor natural pode ser modificado por troca, substituição, adição ou eliminação de um ou mais nucleotídeos sem mudar sua função. A prática da presente invenção engloba mas não é limitada por estas alterações para o promotor. A escolha do promotor usado na constructo genética está dentro do escopo do

conhecimento de um versado na técnica.

A escolha do marcador selecionável apropriado irá depender da célula hospedeira. Marcadores apropriados para diferentes hospedeiros bacterianos são bem-conhecidos na técnica. Os genes de marcador selecionável típicos codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou
5 outras toxinas (por exemplo, ampicilina, metotrexato, tetraciclina, neomicina, ácido micofenólico, puromicina, zeomicina, ou higromicina; ou (b) complementam uma mutação auxotrófica ou uma deficiência nutricional naturalmente ocorrendo na cepa hospedeira.

10 Em algumas modalidades, uma seqüência codificando PI selecionada é inserida em um vetor apropriado de acordo com técnicas recombinantes bem-conhecidas e usadas para transformar uma linhagem de células capaz de expressão de PI. Devido à degenerescência interna do código genético, outras seqüências de ácido nucléico que codificam substancialmente
15 a mesma ou uma seqüência funcionalmente equivalente de aminoácidos podem ser usadas para clonar e expressar um inibidor de protease específico, como ainda detalhado acima. Assim, é notado que estas substituições na região de codificação se encontra dentro das variantes de seqüência cobertas pela presente invenção. Qualquer uma e todas estas variantes de seqüência
20 podem ser utilizadas do mesmo modo como aqui descrito para uma seqüência de ácido nucléico codificando PI parental. Os versados na técnica reconhecem que diferentes PIs serão codificados por seqüências de ácido nucléico diferentes.

Em algumas modalidades, uma vez que se obtém a forma desejada de uma seqüência de ácido nucléico de inibidor de protease, homólogo,
25 variante ou seu fragmento, ela é modificada por qualquer um de vários modos. Onde a seqüência envolve regiões de flanco de não codificação, as regiões de flanco podem ser submetidas a ressecção, mutagenese etc. Assim, transições, transversões, deleções, e inserções podem ser realizadas na
30 seqüência ocorrendo naturalmente.

Em algumas modalidades preferidas, constructos heterólogos de ácido nucléico incluem a seqüência codificando para pelo menos um inibidor

de protease, ou suas variante(s), fragmento(s) ou variante(s) de emenda: (i) em isolamento; (ii) em combinação com seqüências de codificação adicionais; como seqüências de codificação de proteína de fusão ou peptídeo de sinal, onde a seqüência de codificação de PI é a seqüência de codificação dominante; (iii) em combinação com seqüências de não codificação, como elementos de controle, como elementos de promotor e terminador ou regiões não traduzidas 5' e/ou 3', efetivas para a expressão da seqüência de codificação em um hospedeiro apropriado; e/ou (iv) em um vetor ou meio hospedeiro em que a seqüência de codificação de PI é um gene heterólogo.

10 Em algumas modalidades, ácido nucléico heterólogo contendo a seqüência de codificação de ácido nucléico apropriada, junto com as seqüências apropriadas de promotor e controle, é empregado para introduzir em células hospedeiras bacterianas para permitir que as células expressem pelo menos um inibidor de protease ou suas variantes.

15 Em algumas modalidades da presente invenção, uma constructo de ácido nucléico heteróloga é empregada para transferir uma seqüência de ácido nucléico codificando PI em uma célula *in vitro*. Em algumas modalidades preferidas, as células hospedeiras integram estavelmente as seqüências de ácido nucléico da presente invenção. Assim, qualquer método apropriado para gerar de modo eficaz transformantes estáveis encontra uso na presente invenção.

20 Em modalidades adicionais da presente invenção, o primeiro e o segundo cassetes de expressão estão presentes em um vetor único, enquanto em outras modalidades estes cassetes estão presentes em vetores separados.

25 Em algumas modalidades preferidas, além da seqüência de promotor, o cassete de expressão também contém uma região de terminação de transcrição a jusante do gene estrutural para prover uma terminação eficiente. Em alguma modalidades, a região de terminação é obtida do mesmo gene como a seqüência de promotor, enquanto em outras modalidades ela é obtida a partir de outro gene. A seleção de sinais de terminação de transcrição apropriados é bem-conhecida dos versados na técnica.

Além disso, contempla-se que qualquer vetor de expressão apropriado irá encontrar uso na presente invenção. De fato, contempla-se que vários vetores convencionais usados para expressão em células eucarióticas ou procarióticas serão apropriados e encontram uso com a presente invenção. Os vetores de expressão bacterianos padrões incluem bacteriófagos λ e M13, assim como plasmídeos como plasmídeos à base de pBR322, pSKF, pET23D, e sistemas de expressão de fusão, como MBP, GST, e LacZ. Em outras modalidades, etiquetas de epítomos são adicionadas a proteínas recombinantes, a fim de prover métodos convenientes de isolamento (por exemplo, c-myc).

Elementos adicionais tipicamente incluídos em vetores de expressão são replicons, um gene codificando resistência a antibiótico para permitir a seleção de bactérias que abrigam plasmídeos recombinantes, e sítios de restrição singulares em regiões do plasmídeo não essenciais para permitir a inserção de seqüências heterólogas. O gene de resistência a antibiótico particular escolhido não é crítico, sendo qualquer um dos muitos genes de resistência conhecidos na técnica apropriado.

Introdução de uma seqüência de ácido nucléico codificando inibidor de protease em células hospedeiras.

Em algumas modalidades preferidas, os métodos da presente invenção fornecem células hospedeiras que contém uma seqüência de interesse estavelmente integrada (isto é ácido nucléico codificando PI). No entanto, em modalidades alternativas, os métodos da presente invenção provêm a manutenção de um vetor de transformação extra-cromossômico, auto-replicante.

A invenção ainda provê células e composições de células que foram geneticamente modificadas para compreender uma seqüência de ácido nucléico codificando PI provida exogenamente. Em algumas modalidades, uma célula hospedeira parental é geneticamente modificada por um vetor de expressão. Em algumas modalidades, o vetor é um plasmídeo, enquanto em outras modalidades o vetor é uma partícula viral, fago, DNA desprotegido, etc. Assim, não se pretende que a forma do vetor seja limitada a

qualquer tipo de vetor em particular, os vários vetores irão encontrar uso na presente invenção.

Várias métodos podem ser empregados for liberar um vetor de expressão nas células em *vitro*. Métodos de introdução de ácidos nucleicos em células para a expressão de seqüências de ácido nucleico heterólogas são também conhecidos do versado na técnica comum, incluindo, mas não limitados a eletroporação, fusão de protoplastos com células intactas; transdução; bombardeio em alta velocidade com microprojéteis revestidos com DNA; infecção com ácidos nucleicos virais modificados (por exemplo, fago); transformação quimicamente mediada, competência, etc. Além disso, em algumas modalidades, constructos de ácido nucleico heterólogas compreendendo uma de seqüência ácido nucleico PI são transcritas *in vitro*, e o RNA resultante introduzido na célula hospedeira por qualquer um dos métodos apropriados conhecidos na técnica.

Após a introdução de uma constructo de ácido nucleico heteróloga compreendendo a seqüência de codificação para um inibidor de protease, as células geneticamente modificadas são cultivadas em meio nutriente convencional modificado como apropriado para ativar promotores, selecionar transformantes, e/ ou amplificar a expressão de uma seqüência de ácido nucleico codificando PI. As condições de cultura, como temperatura, pH e outros, são as previamente usadas para a célula hospedeira selecionada para expressão, e são evidentes para os versados na técnica.

A progênie de células em que tais constructos de ácido nucleico heterólogas foram introduzidas é geralmente considerada para compreender a seqüência de ácido nucleico codificando PI encontrada na constructo de ácido nucleico heteróloga.

Hospedeiros Bacterianos e Expressão

Células hospedeiras apropriadas incluem qualquer espécie bacteriana apropriada. Em algumas modalidades, os hospedeiros bacterianos servem tanto como hospedeiros de expressão como a fonte dos primeiro e segundo ácidos nucleicos. Usando os presentes métodos e células hospedeiras inventivos, níveis surpreendentes de expressão foram obtidos. O sis-

tema utilizado aqui alcançou níveis de expressão e secreção acima de 0,5 g/l de inibidor de protease..

Após o vetor de expressão ser introduzido nas células hospedeiras, as células hospedeiras transfectadas são cultivadas sob condições favorecendo a expressão do gene codificando a proteína desejada. Grandes lotes de células transformadas podem ser cultivados como descrito acima. Finalmente, o produto é recuperado da cultura usando técnicas conhecidas na técnica.

As proteínas acessórias, como tiol-dissulfeto oxidoreductases ou "chaperones" encontram uso em algumas modalidades, como elas podem benéficas para ajudar a duplicar a proteína secretória em sua conformação ativa. Tiol-dissulfeto oxidoreductases e proteína dissulfeto isomerases catalisam a formação das ligações dissulfeto corretas na proteína. A superexpressão do operon *bdbDC* em *B. subtilis* foi demonstrada como benéfica para a produção de uma proteína com ligações dissulfeto (Ver por exemplo, Meima *et al.*, J. Biol. Chem., 277:6994-7001, [2002]). "Chaperones" ajudam as proteínas secretórias a duplicar por ligação às regiões hidrofóbicas expostas nos estados não duplicados e prevenir interações desfavoráveis e prolil-peptidil cis-trans isomerases ajudam na formação da conformação apropriada da cadeia de peptídeo adjacente a resíduos prolina.

Em algumas modalidades da presente invenção, as células hospedeiras são transformadas com um vetor de expressão codificando pelo menos um tiol-dissulfeto oxidoreductase ou *chaperone*. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer particular tiol-dissulfeto oxidoreductase ou *chaperone*, como qualquer tiol-dissulfeto oxidoreductase ou *chaperone* apropriado conhecido dos versados na técnica irão encontrar uso na presente invenção.

Em algumas modalidades da presente invenção, a fração de proteína secretória apropriadamente duplicada é aumentada pela adição de produtos químicos ao meio de crescimento que reduz/oxida ligações dissulfeto, e/ou alteram o potencial redox geral, e/ou produtos químicos que alteram as propriedades de solvente, assim afetando a conformação e agrega-

ção de proteína. Em modalidades particularmente preferidas, um reagente que reduz ligações dissulfeto, como 2-mercaptoetanol, é preferido para aumentar a fração proteína corretamente duplicada. No entanto, em outras modalidades e dependendo do meio usado, outros redutores de dissulfeto ou agentes oxidantes (por exemplo, DTT, TCEP, glutathione reduzida e oxidada, cisteína, cistina, cisteamina, tioglicolato, $S_2O_3^{2-}$, $S_2O_4^{2-}$, $S_2O_5^{2-}$, SO_3^{2-} , $S_2O_7^{2-}$, Cu^+ , etc.), ou usados sozinhos ou em combinação, encontram uso na presente invenção. Contempla-se que outros adjuvantes que alteram as propriedades de solventes, (por exemplo, uréia, DMSO, TWEEN®-80, etc.), ou adicionados ao meio de crescimento sozinhos ou preferivelmente em combinação com agentes redutores/oxidantes de dissulfeto, como β ME, também irão aumentar a fração de proteína secretória corretamente duplicada e encontram uso em várias modalidades da presente invenção. Em algumas modalidades preferidas, o β ME é usado a concentrações na faixa de 0,5 a 4 mM, enquanto em outras modalidades, a faixa de concentrações de 0,1 mM a 10 mM. De fato, os versados na técnica sabem como selecionar o melhor meio de crescimento e as condições de crescimento para otimizar os efeitos dos agentes redutores/oxidantes de tiol adicionados e/ou outros adjuvantes, assim como a concentração dos agentes redutores/oxidantes de tiol e/ou outros adjuvantes a usar. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer agentes redutores/oxidantes de dissulfeto ou adjuvantes particulares, como quaisquer reagentes apropriados conhecidos dos versados na técnica encontram uso na presente invenção.

Parâmetros de fermentação

A presente invenção baseia-se em procedimentos de fermentação para cultivar as espécies bacterianas. Os procedimentos de fermentação para a produção de proteínas heterólogas por espécies bacterianas são bem-conhecidos na técnica. O cultivo é alcançado em um meio de crescimento compreendendo um meio de sal mineral aquoso, fatores de crescimento orgânicos, o carbono e material de fonte de energia, oxigênio molecular (para bactérias aeróbicas e facultativas), e, como evidente, um inóculo de partida de uma ou mais espécies de microorganismos em particular a serem

empregadas.

Além da fonte de energia e carbono, oxigênio, nitrogênio assimilável e um inóculo do microorganismo, é necessário suprir quantidades apropriadas de nutrientes minerais para assegurar o crescimento apropriado do microorganismo, assimilar a assimilação do carbono e fonte de energia pelas células no processo de conversão microbiano, e obter rendimentos celulares máximos com densidade de células máxima no meio de fermentação.

Vários meios de cultura encontram uso na presente invenção, como conhecido dos versados na técnica. No entanto, meios de culturas bacterianas padrões encontram uso na presente invenção. Em algumas formulações de meios preferidos, os meios incluem além de nitrogênio, quantidades apropriadas de fósforo, magnésio, cálcio, potássio, enxofre, e sódio, em formas apropriadas iônicas assimiláveis solúveis e combinadas, e também presentes preferivelmente devem estar alguns elementos de traço como cobre, manganês, molibdênio, zinco, ferro, boro, e iodo, e outros, novamente em forma assimilável solúvel apropriada, como as conhecidas na técnica.

Em algumas modalidades, a reação de fermentação envolve um processo aeróbico em que o oxigênio molecular necessário é fornecido por um gás contendo oxigênio molecular como ar, ar enriquecido com oxigênio, ou ainda oxigênio molecular substancialmente puro, provido para manter os conteúdos do vaso de fermentação com uma pressão parcial de oxigênio apropriada, efetiva para auxiliar a espécie de microorganismo a crescer em um modo próspero. Com efeito, por uso de um substrato oxigenado de hidrocarboneto, a exigência de oxigênio para o crescimento do microorganismo é reduzida. Mesmo assim, oxigênio molecular deve ser fornecido para o crescimento de organismos aeróbicos e, em uma menor extensão, facultativos.

Apesar da taxa de aeração poder variar em uma faixa considerável, aeração geralmente é conduzida a uma taxa que está na faixa de cerca de 0,5 a 10, preferivelmente cerca de 0,5 a 7, volumes (na pressão em-

pregada e a 25°C.) de gás contendo oxigênio por volume de líquido no fermentador por minuto. Esta quantidade é baseada em ar de teor de oxigênio normal sendo fornecido o reator, e em termos de oxigênio puro, as faixas respectivas devem ser de cerca de 0,1 a 1,7 ou preferivelmente cerca de 0,1 a 1,3, volumes (na pressão empregada e a 25°C.) de oxigênio por volume de líquido no fermentador por minuto.

A pressão empregada para o processo de conversão microbiano pode variar amplamente. As pressões geralmente estão na faixa de cerca de 0 a 3,5 kg/cm² manométricos, atualmente preferivelmente cerca de 0 a 2,1 kg/cm² manométricos, mais preferivelmente pelo menos pelo menos levemente acima da pressão atmosférica, como um equilíbrio de equipamento e custo de operação versus a solubilidade em oxigênio obtida. Pressões maiores do que a atmosférica são vantajosas em que estas pressões tendem a aumentar a concentração de oxigênio dissolvido no fermento aquoso, que pode sua vez pode ajudar a aumentar as taxas de crescimento celular. Ao mesmo tempo, isto é equilibrado pelo fato de que pressões atmosféricas de fato aumentam os custos de equipamento e operação.

A temperatura de fermentação pode variar um pouco, mas para a maior parte das espécies bacterianas usadas na presente invenção, a temperatura geralmente estará na faixa de cerca de 20°C a 40°C, geralmente preferivelmente a faixa de cerca de 28°C a 37°C, dependendo da cepa do microorganismo escolhido, como conhecido dos versados na técnica.

Os microorganismos também requerem uma fonte of nitrogênio assimilável. A fonte of nitrogênio assimilável pode ser qualquer composto contendo nitrogênio ou compostos capazes de liberar nitrogênio em uma forma apropriada para a utilização metabólica pelo microorganismo. Apesar de vários compostos orgânicos de fonte de nitrogênio, como hidrolisados de proteína, poderem ser empregados, geralmente compostos contendo nitrogênio baratos - como amônia, hidróxido de amônio, uréia, e vários sais de amônio como fosfato de amônio, sulfato de amônio, pirofosfato de amônio, cloreto de amônio, ou vários compostos de amônio podem ser utilizados. O próprio gás amônia é conveniente para operações em larga escala, e pode

ser empregado por borbulhamento do fermento aquoso (meio de fermentação) em quantidades apropriadas. Ao mesmo tempo, esta amônia também pode ser empregada para auxiliar no controle de pH.

5 A faixa de pH no fermento microbiano aquoso (mistura de fermentação) deve estar na faixa exemplar de 2,0 a 8,0. No entanto, os ótimos de faixa de pH para alguns microorganismos são dependentes dos meios empregados em alguma extensão, assim como do microorganismo particular, e assim mudam um pouco com mudança em meios como conhecido dos versados na técnica.

10 Apesar do tempo de retenção médio da mistura de fermentação no fermentador poder variar consideravelmente, dependendo em parte da temperatura de fermentação e da cultura empregada, como é conhecido na técnica.

15 Em algumas modalidades, a fermentação é preferivelmente conduzida em tal modo que o substrato contendo carbono pode ser controlado como um fator de limitação, assim provendo uma boa conversão do substrato contendo carbono nas células e evitando a contaminação das células com uma quantidade substancial de substrato não convertido. O último não é um problema com substratos solúveis em água, porque quaisquer traços restantes são prontamente removidos. Isto pode ser um problema, no entanto, nos casos de substratos não solúveis em água, e requer etapas de tratamento de produto adicionais como etapas de lavagem apropriadas. O tempo necessário para alcançar este nível de substrato limitante não é crítico e pode variar com o microorganismo e processo de fermentação em particular sendo conduzido. No entanto, é bem-conhecida na técnica a determinação da concentração de fonte de carbono no meio de fermentação e se ou não o nível desejado de fonte de carbono foi obtido.

25 Apesar em algumas modalidades, a fermentação ser conduzida como uma operação em batelada ou contínua, a operação em batelada alimentada é geralmente preferida para facilidade de controle, produção de
30 quantidades uniformes de produtos, e os usos mais econômicos de todo o equipamento.

Se desejado, parte ou todo o material de fonte de energia e carbono e/ou parte da fonte assimilável de nitrogênio como amônia pode ser adicionado ao meio mineral aquoso antes da alimentação ao meio aquoso mineral no fermentador. De fato, cada uma das correntes introduzida no reator preferivelmente é controlada a uma relação predeterminada, ou em resposta a uma necessidade determinável por monitoração como concentração do substrato de energia e carbono, pH, oxigênio dissolvido, oxigênio ou dióxido de carbono nos gases residuais do fermentador, densidade de células mensurável por transmitância de luz ou similares. As taxas e alimentação dos vários materiais podem ser variadas de modo a obter uma taxa de crescimento de células tão rápida como possível, consistente com utilização eficiente da fonte de energia e carbono, para obter um rendimento tão elevado de células de microorganismos relativo à carga do substrato com possível, mas, mais importante, para obter a maior produção da desejada proteína por volume unitário.

Em uma operação em batelada, ou na preferida batelada alimentada, todo o equipamento, reator, ou meios de fermentação, vaso ou recipiente, tubulações, dispositivos de resfriamento ou circulação anexos, e outros, são inicialmente esterilizados, geralmente por emprego de vapor como a cerca de 121°C durante pelo menos cerca de 15 minutos. O reator esterilizado então é inoculado com uma cultura do microorganismo selecionado na presença de todos os requeridos nutrientes, incluindo oxigênio, e o substrato contendo carbono. O tipo de fermentador empregado não é crítico, apesar de em algumas modalidades, o 15L Biolafitte (Saint-Germain-en-Laye, France) ser preferido.

Separações de proteínas

Em algumas modalidades particularmente preferidas, uma vez que a desejada proteína é expressada, a proteína secretada é recuperada. A presente invenção provê métodos de separação de uma proteína desejada de seu análogo de fusão. É especificamente contemplado que os métodos como aqui descritos irão encontrar uso na separação de inibidor de proteínase e variantes do análogo de fusão.

A coleta e purificação da proteína desejada do caldo de fermentação também pode ser obtida usando procedimentos como conhecidos dos versados na técnica. O caldo de fermentação irá geralmente conter resíduos celulares, incluindo células, vários sólidos em suspensão e outros contaminantes de biomassa, assim como os produtos de proteína desejada, que são preferivelmente removidos do caldo de fermentação por meios conhecidos na técnica. Os processos apropriados para esta remoção incluem separações técnicas sólido-líquido convencionais (por exemplo, centrifugação, filtração, diálise, microfiltração, filtração com vácuo giratório, ou outros processos conhecidos), para produzir um filtrado isento de células. Em algumas modalidades, é preferível ainda concentrar o caldo de fermentação ou o filtrado isento de células antes do processo de purificação e/ou cristalização usando técnicas como ultrafiltração, evaporação e/ou precipitação.

Precipitação dos componentes proteínicos do sobrenadante ou filtrado pode ser obtida por meio de um sal (por exemplo, sulfato de amônio) ou pH baixo (tipicamente menor do que 3), seguido por purificação por uma variedade de procedimentos cromatográficos (por exemplo, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia por indução de carga hidrofóbica etc.) ou procedimentos reconhecidos na técnica similares. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer método de separação particular, pois contempla-se que qualquer método irá encontrar uso na presente invenção.

Em algumas modalidades preferidas, quando o polipeptídeo expressado desejado é secretado das células bacterianas, o polipeptídeo é purificado a partir do meio de crescimento. Em modalidades preferidas, as células hospedeiras de expressão são removidas dos meios antes da purificação do polipeptídeo (por exemplo por centrifugação).

Quando o polipeptídeo recombinante expressado desejado não é secretado da célula hospedeira, a célula hospedeira é preferivelmente rompida e o polipeptídeo liberado em um "extrato aquoso" que é o primeiro estágio de purificação. Preferivelmente, as células hospedeiras de expressão são coletadas dos meios antes da ruptura da célula (por exemplo por

centrifugação). A ruptura das células pode ser realizada por uso de quaisquer meios apropriados bem-conhecidos na técnica, como por digestão de beta-glucanase ou lisozima ou forçando as células através de pressão elevada (vide, por exemplo, Scobes, Protein Purification, 2a. Ed., Springer-Verlag).

Em algumas modalidades, a adição de seis resíduos de histidina (isto é, uma "His Tag") para o C-término é usada como um auxiliar na purificação da proteína desejada e seu análogo de fusão. O uso de etiquetas "His tags" como um auxiliar de purificação é bem-conhecido na técnica (Ver por exemplo, Hengen, TIBS 20:285-286 [1995]). As proteínas etiquetadas 6x his são facilmente purificadas usando Cromatografia de afinidade de íon metal imobilizado (IMAC), como conhecido dos versados na técnica.

Pureza

Para algumas aplicações, é de grande importância que os inibidores de protease produzidos usando a presente invenção sejam altamente puros (por exemplo, tendo uma pureza maior do que 99%). Isto é particularmente verdadeiro sempre que a desejada proteína deve ser usada como um agente terapêutico, mas é também necessário para outras aplicações. Os métodos são como aqui descritos para prover um modo de produzir substancialmente as proteínas puras desejadas. As proteínas desejadas como aqui descrito são utilizáveis em composições farmacêuticas e de cuidado pessoal. No entanto, contempla-se que proteínas de variados níveis de pureza serão produzidas usando os métodos da presente invenção e não se pretende que as proteínas produzidas usando a presente invenção sejam limitadas a qualquer nível particular de pureza.

Ativação de BBI durante a purificação

Em algumas modalidades da presente invenção, após o crescimento durante o processo de purificação, a atividade de uma proteína é aumentada pela adição de produtos químicos que reduzem/oxidam ligações dissulfeto e/ou alteram o potencial redox geral, e/ou produtos químicos que alteram as propriedades de solventes, assim afetando a conformação e agregação de proteínas. Em algumas modalidades particularmente preferidas,

adição de um reagente que reduz ligações dissulfeto, como 2-mercaptoetanol, é usada para aumentar atividade da proteína. No entanto, como os versados na técnica sabem, dependendo da pureza e composição do tampão, outros agentes redutores ou oxidantes de dissulfeto (por exemplo, DTT, TCEP, glutathiona reduzida e oxidada, cisteína, cistina, cisteamina, tioglicolato, $S_2O_3^{2-}$, $S_2O_4^{2-}$, $S_2O_5^{2-}$, SO_3^{2-} , $S_2O_7^{2-}$, Cu^+ , proteína dissulfeto isomerases, proteína tiol-dissulfeto oxidoreductases, etc.), ou usados sozinhos ou em combinação, encontram uso na presente invenção. Outros adjuvantes que alteram as propriedades de solventes, (por exemplo etanolamina, DMSO, TWEEN®-80, arginina, uréia, etc.), ou adicionados sozinhos ou preferivelmente em combinação com agentes redutores/oxidantes de dissulfeto, como β ME, durante o processo de purificação também encontram uso na presente invenção por aumento da atividade da proteína. Em algumas modalidades preferidas, proteína parcialmente purificada é diluída em tampão (em algumas modalidades particularmente preferidas, um tampão zwitteriônico com TWEEN®-80 em pH básico) e ativado com β ME e um agente oxidante de dissulfeto (em modalidades preferidas alternativas, glutathiona oxidada ou um sulfito de sódio).

Além disso, contempla-se que condições serão triadas a fim de determinar a ativação ótima da proteína, se desejado. Por exemplo, várias concentrações de β ME (0,1 – 10 mM), concentrações de agentes oxidantes (0 a 1/20 a 20 vezes a concentração de β ME) pH (7,5 – 9,5), temperaturas (15 – 40°C), diluições (1 – 20 vezes), tempos de incubação (12 – 72 h), aeração (incubações sob gás inerte para uma mistura vigorosa sob gases contendo oxigênio), tipos de tampão (Tris, CHES, CAPS, Tricine, TAPS, outros tampões zwitteriônicos, etc.), concentrações de tampão (0,1 – 1 M), e a adição de vários adjuvantes conhecidos como alterando as propriedades de solvente, assim afetando a conformação e agregação de proteínas (por exemplo, etanolamina, DMSO, TWEEN®-80, arginina, uréia, etc.) são testados a fim de determinar as condições ótimas para o sistema de expressão usado. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a quaisquer agentes redutores/oxidantes de dissulfeto particulares, diluição, temperatura,

pH, tipo de tampão ou composição, ou adjuvante, como quaisquer reagentes apropriados conhecidos dos versados na técnica encontram uso na presente invenção.

Composições de cuidado pessoal

5 Em modalidades particularmente preferidas, a presente invenção provê compostos cosméticos e/ou farmacêuticos para melhorar a aparência da pele compreendendo pelo menos um polipeptídeo ou um peptídeo. Em algumas modalidades preferidas, o polipeptídeo ou peptídeo liga o VEGF. Em modalidades alternativas, a ligação do polipeptídeo ou peptídeo a VEGF bloqueia a atividade a jusante do VEGF. Em algumas modalidades, os compostos compreendem pelo menos um peptídeo, enquanto em outras modalidades, os compostos compreendem pelo menos um polipeptídeo. Em algumas modalidades preferidas, o peptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-7, 10 16, e 17. Em modalidades preferidas adicionais, o peptídeo tem uma seqüência de ligação conservada, a seqüência sendo XXLWPXWC (SEQ ID NO:15). Em algumas modalidades preferidas, o peptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-24. Em modalidades preferidas alternativas, os compostos têm 20 uma seqüência, a seqüência sendo pelo menos 70%, preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90%, e o mais preferivelmente 95% homóloga com as seqüências especificadas aqui. Em algumas modalidades preferidas, o polipeptídeo tem um peso molecular que está preferivelmente entre 500 Dáltons e 30.000 Dáltons, mais preferivelmente entre 1000 Dáltons e 10.000 Dáltons, 25 e o mais preferivelmente de 1500 Dáltons a 8.000 Dáltons.

Em algumas modalidades preferidas, os compostos encontram uso na melhora da pele em um organismo (isto é, indivíduo) tendo um distúrbio de pele. Em algumas modalidades preferidas, o distúrbio de pele é um distúrbio angiogênico de pele. Em modalidades preferidas adicionais, o distúrbio de pele é pelo menos um selecionado dentre o grupo consistindo em 30 psoríase, úlceras venosas, acne, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas e linfangiogênese, etc. Em algumas modalidades particularmente preferidas,

o distúrbio de pele é rosácea.

Não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer tratamento ou condição de pele particular. Por exemplo, cor da pele tem sido um aspecto de preocupação para seres humanos há muitos anos.

5 Em particular, se nota um desejo de remover a hiperpigmentação associada com manchas de idade, sardas, e outras áreas de escurecimento da pele devido a idade ou outros fatores. Uma complexão uniformemente colorida (isto é, sem áreas de vermelhidão, escuras ou brancas) é preferida por muitos indivíduos. Além disso, em algumas áreas, branqueamento da pele é um
10 efeito desejado, enquanto em outros a pele bronzeada é preferida. Vários compostos foram usados para obter uma despigmentação, incluindo ácido kojic, hidroxiquinona, e retinóides. Várias pesquisas foram devotadas à produção de uma pele bronzeada sem o uso de radiação a fim de evitar fotodano. Os compostos que têm encontrado uso no bronzeamento da pele sem
15 exposição solar incluem dihidroxiacetona e produtos químicos similares. No entanto, os resultados obtidos com estes produtos geralmente não são ótimos, como uma aplicação precisa e uniforme é requerida a fim de obter o resultado desejado. Além disso, muitos destes compostos são irritantes na pele.

20 A base química e enzimática da melanogenese é bem-conhecida. Os melanócitos migram da cresta neural embrional neural dentro da pele para produzir os grânulos secretórios conhecidos como melanossomas, que produzem melanina via melanogenese. A melanina produzida por estas células é então distribuída aos queratinócitos pelos dendritos de melanócito. A
25 enzima chave em melanogenese é tirosinase, que inicia uma cascata de reações que convertem tirosina em melanina, que é um polímero. Duas proteínas relacionadas com tirosinase (TRP's) são conhecidas, que compartilham cerca de 40% de homologia com tirosinase. Estas proteínas (TRP-1 e TRP-2) têm atividades catalíticas assim como papéis regulatórios em melanogenese. TRP-1 é relatado como sendo a glicoproteína mais abundante em
30 melanócitos.

Apesar da base química e enzimática de melanogenese ser bem

documentada, sua regulação ao nível celular é somente parcialmente entendida. Tirosinase e os TRP's compartilham propriedades estruturais e biológicas com a família dos genes da proteína de membrana associada lisossomal (LAMP). Assim, foi contemplado que sua marcação para a membrana melanossomal pode induzir sua ativação. É também contemplado que a reação de fosforilação/desfosforilação ocorrendo nas caudas citoplásmicas destas proteínas pode estar envolvida na regulação de melanogenese. A isoforma beta da família de proteína quinase C (PKC) foi demonstrada como regulando a melanogenese humana através da ativação de tirosinase. A expressão de genes de tirosinase, TRP-1 e TRP-2 é coordenada. Além disso, todas as três enzimas são expressadas na epiderme humana.

O receptor ativado por 2- protease- (PAR-2) é um receptor copulado a proteína G de sete transmembranas, que está relacionado com, mas é distinto dos receptores de trombina (TR também nomeado PAR-1, e PAR-3) em sua seqüência. Ambos os receptores são ativados proteoliticamente por uma clivagem de arginina-serina ao domínio extracelular. Os N-términos recentemente criados então ativam estes receptores como ligandos amarrados. Ambos os receptores podem ser ativados por tripsina, mas somente os TRs são ativados por trombina. Além disso, somente PAR-2 é ativado por triptase de células-tronco. Ambos os receptores também podem ser ativados pelo peptídeos que correspondem a seus novos N-términos, independentes de clivagem do receptor. Além disso, um peptídeo com a seqüência SLIGRL (SEQ ID NO:32), conhecido como sendo um peptídeo ativador de PAR-2 de camundongo, é equípote na ativação do receptor humano. Apesar das funções de TR serem bem documentadas, a biologia do sistema PAR-2 ainda não foi completamente identificada. No entanto, um papel para a ativação de PAR-2 na inibição de crescimento e diferenciação de queratinócitos foi recentemente descrito (Derian *et al.*, Cell Growth Different., 8:743-749 [1997]).

Em outras modalidades preferidas, a presente invenção provê compostos cosméticos e/ou farmacêuticos para melhorar a aparência da pele. Nestas modalidades preferidas, os compostos compreendem pelo me-

nos um peptídeo ou polipeptídeo dentro de pelo menos um suporte de esqueleto, o peptídeo ou polipeptídeo sendo expressado no suporte de esqueleto. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o pelo menos um peptídeo ou polipeptídeo é um laço. Em outras modalidades particularmente preferidas, o laço é fechado por uma ligação dissulfeto. Em algumas modalidades preferidas, o polipeptídeo ou peptídeo liga a VEGF. Em modalidades alternativas, a ligação do polipeptídeo ou peptídeo a VEGF bloqueia a atividade a jusante do VEGF. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o peptídeo é expressado em um esqueletoresistente a protease. Em algumas modalidades especialmente preferidas, o esqueleto compreende um inibidor de protease (por exemplo, inibidor de BBI, STI, ou quimotripsina Elgin). Em algumas modalidades mais preferidas, o inibidor de protease é BBI.

Em algumas modalidades preferidas, os compostos ainda compreendem pelo menos um peptídeo. Preferivelmente, o peptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS: 1-7, 16, e 17. Em determinada alternativa, peptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS: 14). Em algumas modalidades, os compostos compreendem uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-24. O mais preferivelmente, os compostos compreendem SEQ ID NO:22. Em algumas modalidades preferidas, o peptídeo tem uma seqüência de ligação conservada, a seqüência sendo X-XLWPXWC (SEQ ID NO:15). Em algumas modalidades preferidas, os compostos têm uma seqüência, a seqüência sendo pelo menos 70%, preferivelmente 80%, mais preferivelmente 90%, e o mais preferivelmente 95% idêntica às seqüências especificadas aqui. O peso molecular do peptídeo está preferivelmente entre 500 Dáltons e 45.000 Dáltons, mais preferivelmente entre 1000 Dáltons e 12.000 Dáltons, e o mais preferivelmente de 1500 Dáltons a 10.000 Dáltons. Em algumas modalidades preferidas, os compostos compreendem pelo menos um polipeptídeo.

Em algumas modalidades preferidas, os compostos são usados para a melhora da pele em um organismo (isto é, um indivíduo) tendo um

distúrbio de pele. Em modalidades preferidas adicionais, o distúrbio de pele é pelo menos um selecionado dentre o grupo consistindo em psoríase, úlceras venosas, acne, rosácea, verrugas, eczema, hemangiomas e linfangiogênese, etc. Em algumas modalidades particularmente preferidas, o distúrbio de pele é rosácea.

Em ainda outras modalidades, a presente invenção provê composições cosméticas e/ou farmacêuticas compreendendo pelo menos um polipeptídeo ou peptídeo, como especificado aqui, e um veículo ou excipiente fisiologicamente aceitável. Preferivelmente, o composto está presente em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 5% em peso com base no peso total da composição. Também preferivelmente, o composto está presente em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% em peso com base no peso total da composição. Composição pode estar na forma de um veículo emulsificado, como um creme ou loção nutritiva, um gel estabilizado ou sistema de dispersão, um soro de tratamento, um sistema de distribuição lipossomal, uma máscara ou porção tópica, um sistema de limpeza à base de tensoativos como um xampu ou líquido de limpeza corporal, uma dispersão ou emulsão aerossolizada ou pulverizada, um condicionador para a pele ou cabelo, auxiliar de penteado, ou um produto pigmentado como maquiagem, assim como outras preparações de maquiagem e cosméticas apropriadas. Em algumas modalidades, o veículo é preferivelmente pelo menos um selecionado dentre o grupo consistindo em água, propileno glicol, etanol, propanol, glicerol, butileno glicol e polietileno glicol.

Em modalidades adicionais, a presente invenção provê compostos cosméticos e/ou farmacêuticos compreendendo pelo menos um polipeptídeo ou um peptídeo apropriado para modular o crescimento de cabelo. Em algumas modalidades preferidas, os compostos compreendem pelo menos um polipeptídeo.

Em algumas modalidades preferidas, a modulação compreende o tratamento de pelo menos um doença ou condição que envolve perda de cabelo. Em algumas modalidades preferidas, a doença ou condição é pelo menos uma selecionada dentre o grupo consistindo em alopecias inflamató-

rias, pseudopelada, escleroderma, mordidas de carrapatos, lichen planus, psoríase, lupus, dermatite seborréica, síndrome da perda de cabelo, hemo-cromatose, alopecia androgênica, alopecia areata, câncer, condições que afetam a produção defeituosa de fibras do cabelo, e fatores ambientais que
5 afetam a produção do cabelo. Em algumas modalidades preferidas, a doença é alopecia androgênica ou alopecia areata.

Em algumas modalidades preferidas, a modulação compreende a inibição do crescimento de cabelo e/ou remoção do cabelo para tratamento de pelo menos um doença ou condição para a qual é desejável um cresci-
10 mento diminuído de cabelo. Em algumas modalidades preferidas, a inibição e/ou a remoção compreende depilação.

Em algumas modalidades preferidas, a invenção provê compostos cosméticos e/ou farmacêuticos para modular o crescimento de cabelo compreendendo pelo menos um peptídeo ou polipeptídeo e pelo menos um
15 suporte de esqueleto, o peptídeo ou polipeptídeo estando contido dentro do suporte de esqueleto, preferivelmente o peptídeo ou polipeptídeo sendo um laço, e o mais preferivelmente, o laço sendo fechado por uma ligação dissulfeto. Em algumas modalidades preferidas, o esqueletocompreende STI, E-
glin ou BBI. Em modalidades particularmente preferidas, o esqueletocom-
20 preende BBI. Em modalidades ainda preferidas, o peptídeo ou polipeptídeo compreende um polipeptídeo.

Em ainda outras modalidades, a presente invenção provê meios para diminuir a atividade e/ou níveis de VEGF. Em algumas modalidades preferidas, a atividade e/ou níveis de VEGF são diminuídos na epiderme. Em
25 algumas modalidades, o método compreendendo aplicar uma quantidade efetiva de pelo menos um dos compostos como aqui descritos a um organismo em necessidade do mesmo.

Em modalidades adicionais, a presente invenção provê aplicações para tratamento do cabelo e/ou da pele, assim como aplicações na cicatrização de feridas, tratamento de doenças proliferativas, etc. Assim, a
30 presente invenção provê composições e métodos apropriados para a aplicação em/sobre os seres humanos e outros animais.

Em modalidades preferidas adicionais, a presente invenção é dirigida a pelo menos um esqueletoresistente a protease compreendendo, pelo menos, um peptídeo ou polipeptídeo e, pelo menos, um laço. Os laços nativos flexíveis são encontrados sobre a superfície da maior parte dos módulos de proteína e existem como extensões curtas de aminoácidos que conectam regiões de estrutura secundária definida. Apesar dos estudos cristalográfico e de RMN (ressonância magnética nuclear) demonstrarem que os laços nativos são geralmente menos bem definidos do que as alfa-hélices e beta-folhas, sua liberdade conformacional é normalmente limitada substancialmente comparada com os peptídeos livres. Conseqüentemente, as atividades de ligação dos laços nativos em proteínas geralmente diferem significativamente das da seqüência linear correspondente de aminoácidos. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer mecanismo específico.

Os laços providos pela presente invenção ligam proteínas como VEGF (por exemplo, VEGF-A). A ligação do laço à proteína evita que a proteína se ligue à sua marcação. Assim, pensa-se que as interações de ligação devem ser rompidas por ligação ao laço da proteína. Como um resultado, bioatividade pode ser alterada, como desejado. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer mecanismo em particular.

A presente invenção ainda provê inibidores de protease para estabilizar os laços. STI, BBI e Eglin C tem laços nativos que ligam a e inibem proteases. Em algumas modalidades, laços nativos de STI e BBI são substituídos com os polipeptídeos e/ou peptídeos da invenção. Em algumas modalidades, estas seqüências são substituídas com inibidores ou melhoradores de qualquer VEGF, enquanto que, em outras modalidades, as seqüências são substituídas com inibidores ou melhoradores de VEGF-A. Em modalidades alternativas, as seqüências são substituídas com inibidores de FGF-5, TGFB-1 e TGFB-2, assim como inibidores da via complementar, como inibidores de C2, C3, C4 ou C5 e Compstatina, etc. Em modalidades adicionais, laços nativos de STI e BBI são substituídos com seqüências que

foram isoladas usando várias técnicas conhecidas na técnica (por exemplo, apresentação na superfície de fagos), como as proteínas de ligação a VEGF, como aqui descrito.

Em algumas modalidades, um laço nativo é substituído com um
5 laço que tem 3 a 20 aminoácidos de comprimento, preferivelmente 5 a 15 aminoácidos de comprimento, e mais preferivelmente 5 a 10 aminoácidos de comprimento. Em modalidades alternativas, seqüências mais longas encontram uso, desde que elas proporcionem ligação e/ou inibição. Além disso, peptídeos apropriados para uso como substituições do(s) laço(s) nativo(s)
10 podem formar laços limitados (isto é, um laço formado pela presença a uma ligação dissulfeto entre dois resíduos de cisteína). Em algumas modalidades particularmente preferidas, os peptídeos tem entre 7 e 9 aminoácidos de comprimento.

Existem várias vantagens em usar suportes "scaffold" para esta-
15 bilizar as seqüências de peptídeos. Em algumas modalidades preferidas, a atividade biológica de um peptídeo é maior e/ou eficazmente modula a função biológica como um resultado de limitar a flexibilidade do peptídeo e reduz o custo entrópico de fixação da seqüência de polipeptídeos na conformação bioativa. Além disso, informação estrutural obtida por cristalografia de
20 raios X encontra uso em guiar a maturação por afinidade. Além disso, em algumas modalidades, a seqüência apresentada em um esqueletoestrutural é mais resistente à degradação proteolítica em aplicações biológicas diferentes. Em ainda outras modalidades, a constructo quimérica é obtida em quantidade grande em sistemas de expressão biológicos de baixo custo para a-
25 plicações industriais.

BBI representa uma classe de suportes "scaffold" de proteína cuja ligação a proteases é mediada por um laço nativo exposto que é fixado em uma conformação canônica característica canonical e que se ajusta no sítio ativo em um modo similar, como pensa, ao de um substrato (Laskowski
30 e Kato, Ann. Rev. Biochem., 49:593-626 [1980]; e Bode & Huber, *supra*). O laço nativo é freqüentemente limitado pela presença de pontes dissulfeto e/ou redes de ligação a hidrogênio extensivas que atuam para tratar a estru-

tura na estrutura canônica correta. A seqüência deste laço determina a especificidade da inibição, que espelha a especificidade de proteases para seus substratos. Por exemplo, a maior parte dos inibidores de tripsina tem Arg ou Lys como seu resíduo P1. Inibidores da família de BBI tem uma rede de pontes dissulfeto conservadas que ajudam a formar uma estrutura simétrica de dois domínios tricíclicos (Chen *et al.*, *supra*; Werner e Wemmer, *supra*; e Liu *et al.*, *supra*), cada contendo um sítio de ligação de serina protease independente. O laço nativo de ligação está contido dentro de uma região unida por pontes dissulfeto formadas entre resíduos de cisteína. A identidade do resíduo de aminoácidos no sítio P1 em cada domínio é o determinante principal da serina protease inibida. Os domínios nativos possuem lisina ou arginina para tripsina, leucina ou tirosina para quimotripsina e alanina para elastase (Tsunogae *et al.*, J. Biochem. (Tokyo) 100:243-246 [1986]). Além disso, serina é altamente conservada na posição P'1 e prolina na posição P'3. As regiões de laço nativo individuais de BBI são bem apropriadas para o enxerto de laço de proteína de peptídeos limitados por cisteína previamente identificados, que ligam a marcações seletivamente, como aqui descrito.

Numerosas isoformas de BBI foram caracterizadas. Por exemplo, a seqüência DDESSKPCCDQCACTKSNPPQCRCSDMRLNSCHSACKSCICALSYPAQCF CVDITDFCYE PCKPSEDDKEN (SEQ ID NO:25) proporciona a seqüência de aminoácidos de uma estrutura dorsal de BBI, como aqui descrito. Além disso, em algumas modalidades, BBI é truncado com tantos como 10 resíduos de aminoácidos sendo removidos do N- ou C- terminal. Qualquer uma das isoformas, como aqui descrito, assim como as adicionais conhecidas na técnica, encontra uso como suportes "scaffold" na presente invenção.

A presente invenção provê várias vantagens sobre a criação de, por exemplo, proteínas quiméricas. Transferência de uma proteína completa pode ser difícil quando, por exemplo, o domínio da proteína de interesse transporta mais do que uma atividade biológica importante. Manter uma atividade (por exemplo interações domínio-domínio funcionalmente significan-

tes) enquanto alterando outra (por exemplo, ligação de alta afinidade para um co-fator ou receptor) pode ser problemático. A presente invenção, como indicado aqui, supera esta limitação, como em modalidades preferidas os laços são transferidos, em vez dos domínios completos.

5 Além disso, em algumas modalidades, os compostos da presente invenção compreendem pelo menos uma mutação além da especificada acima. Outras mutações, como deleções, inserções, substituições, transversões, transições e inversões, em um ou mais de outros locais, também encontram uso na presente invenção.

10 Em algumas modalidades, os compostos da presente invenção também compreendem uma substituição conservativa que pode ocorrer como uma substituição similar-a-similar (por exemplo, básica para básica, ácida para ácida, polar para polar etc.). Em modalidades adicionais, substituições não conservativas são providas (isto é, de uma classe de resíduo para
15 outra ou alternativamente envolvendo a inclusão de aminoácidos não naturais, como ornitina, ornitina de ácido diaminobutírico, ornitina de norleucina, pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina e fenilglicina).

Em algumas modalidades, as seqüências também tem deleções, inserções e/ou substituições de resíduos de aminoácidos que produzem uma mudança silente e resultam em uma substância funcionalmente
20 equivalente.

Em algumas modalidades, substituições de aminoácidos deliberadas são feitas com base na similaridade das propriedades de aminoácidos (por exemplo, polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofili-
25 e/ou a natureza anfipática dos resíduos) e são assim utilizáveis para agrupar os aminoácidos juntos em grupos funcionais. Aminoácidos podem ser agrupados juntos com base nas propriedades de sua cadeia lateral sozinha. No entanto, é mais utilizável incluir também os dados de mutação. Os conjuntos de aminoácidos assim derivados são provavelmente conservados por razões
30 estruturais. Estes conjuntos podem ser descritos na forma de um diagrama Venn (Ver por exemplo, Livingstone e Barton, Comput. Appl. Biosci., 9:745-756 [1993]; e (Taylor, J. Theor. Biol., 119:205-218 [1986]). Em algumas mo-

dalidades, substituições conservativas são feitas, por exemplo de acordo com a tabela abaixo que descreve um agrupamento de aminoácidos de diagrama de Venn geralmente aceito.

Conjunto		Sub-conjunto	
Hidrofóbico	F W Y H K M I L V A G C	Aromático	F W Y H
		Alifático	I L V
Polar	W Y H K R E D C S T N Q	Carregado	H K R E D
		Positivamente carregado	H K R
		Negativ. carregado	E D
Pequeno	V C A G S P T N D	Muito pequeno	A G S

- Em algumas modalidades, seqüências variantes de aminoácidos da presente invenção também incluem grupos espaçadores apropriados inseridos entre quaisquer dois resíduos de aminoácidos de uma seqüência incluindo grupos alquila como grupos metila, etila ou propila, além dos espaçadores de aminoácidos como resíduos de glicina ou β -alanina. Uma outra forma de variação envolve a presença de um ou mais resíduos de aminoácidos em forma peptóide.

- Em algumas modalidades, comparações de homologia encontram uso na identificação de seqüências homólogas que encontram uso na presente invenção. As comparações de homologia pode ser conduzidas a olho nú, ou mais geralmente, com a ajuda de programas de comparação de seqüências prontamente disponíveis. Os programas de computador disponíveis podem calcular a homologia percentual entre duas ou mais seqüências. Adicionalmente, a homologia percentual pode ser calculada sobre seqüências contíguas (isto é, uma seqüência é alinhada com a outra seqüência e cada aminoácido em uma seqüência é diretamente comparado com o aminoácido correspondente na outra seqüência, um resíduo de cada vez). Isto é chamado como um alinhamento "não espaçado". Tipicamente, estes alinha-

mentos não espaçados são realizados somente sobre um número relativamente curto de resíduos.

Apesar deste ser um método consistente e muito simples, ele deixa de levar em consideração que, por exemplo, em um par de seqüências de outra forma idêntico, uma inserção ou deleção irá levar os seguintes resíduos de aminoácidos a serem colocados fora de alinhamento, assim potencialmente resultando em uma grande redução em % homologia quando um alinhamento global é realizado. Conseqüentemente, a maior parte dos métodos de comparação de seqüência são projetados para produzir alinhamentos ótimos que levam em consideração possíveis inserções e deleções sem penalizar indevidamente o escore de homologia global. Isto é obtido por inserção de "espaços " em um alinhamento de seqüência de modo a tentar maximizar a homologia local.

No entanto, estes métodos mais complexos designam "penalidades de espaço" a cada espaço que ocorre nos alinhamentos, de modo que para o mesmo número de aminoácidos idênticos, o alinhamento de seqüência com o menor número de espaços possível (isto é, refletindo um maior relação entre as duas seqüências comparadas) irá obter um maior escore do que uma com muitos espaços. "Custos de espaços relacionados por afinidade" são tipicamente usados os quais carregam um custo relativamente elevado para a existência de um espaço e uma menor penalidade para cada resíduo subsequente no espaço. Este é um dos sistemas de classificação de espaços mais comumente usado. As penalidades de espaços elevadas irão produzir, como evidente, alinhamentos otimizados com menos espaços. A maior parte dos programas de alimentação permitem que as penalidades de espaços sejam modificadas. No entanto, prefere-se usar os valores de "default" quando usando este software para as comparações de seqüências. Quando usando o pacote GCG Wisconsin Bestfit, a penalidade de espaço de *default* para seqüências de aminoácidos é -12 e para um espaço e -4 para cada extensão.

Cálculo de % homologia máxima, assim primeiro requer a produção de um alinhamento ótimo, levando em consideração penalidades de

espaço. Um programa de computador apropriado para realizar este alinhamento é o pacote GCG Wisconsin Bestfit (Ver por exemplo, Devereux *et al.*, Nuc. Acids Res., 12:387 [1984]). Exemplos de outros pacotes de software que podem realizar as comparações de seqüências incluem, mas não são
5 limitados ao pacote BLAST FASTA, e a suite GENWORKS de ferramentas de comparações, todos sendo bem-conhecidos dos versados. Ambos BLAST e FASTA são disponíveis para busca *offline* e *online*. No entanto, para algumas aplicações, prefere-se usar o programa GCG Bestfit. O pacote BLAST 2 Sequence é também disponível para comparação de seqüências
10 de proteínas e nucleotídicas.

Apesar da homologia percentual final poder ser medida em termos de identidade, o próprio processo de alinhamento tipicamente não é baseado em uma comparação de pares "tudo ou nada". Ao contrário, uma matriz de escore de similaridade em escala é geralmente usada que define
15 escores para cada comparação à feição de pares com base em similaridade química ou distância evolucionária. Um exemplo desta matriz comumente usada é a matriz BLOSUM62 – a matriz de *default* para a suite de programas BLAST. Os programas GCG Wisconsin geralmente usam ou valores de *default* públicos ou uma tabela de comparação de símbolos de praxe, se fornecida. Para algumas aplicações, prefere-se usar os valores de *default* públicos para o pacote GCG, ou no caso de outro software, a matriz de *default*,
20 como BLOSUM62.

Alternativamente, homologias percentuais podem ser calculadas usando o aspecto de alinhamento múltiplo em DNASI[®] (Hitachi Software),
25 com base em um algoritmo, análogo a CLUSTAL (Ver por exemplo, Higgins e Sharp, Gene 73:237-244 [1988]).

Uma vez que o software produziu um alinhamento ótimo, é possível calcular a porcentagem de homologia, e mais preferivelmente, o porcentagem de identidade de seqüência. O software tipicamente realiza isto
30 como parte de uma comparação de seqüência e gera um resultado numérico.

Em algumas modalidades, a presente invenção provê ácidos

nucléicos codificando qualquer um dos compostos como aqui descritos, assim como seus complementos. Em modalidades preferidas adicionais, a invenção provê vetores compreendendo um composto, como descrito aqui, células compreendendo o composto e métodos de expressar o composto.

5 Os versados na técnica apreciam a relação entre as seqüências de ácido nucléico e seqüências de polipeptídeos, em particular como relacionadas com o código genético e a degenerescência deste código, e serão capazes de construir estes ácidos nucléicos sem dificuldade. Por exemplo, um versados na técnica sabe que, para cada substituição de aminoácido em
10 uma seqüência, pode-se ter um ou mais códons que codificam o aminoácido substituto. Assim, é evidente que, dependendo da degenerescência do código genético com relação ao resíduo de aminoácidos particular, uma ou mais seqüências de ácido nucléico pode ser gerada correspondendo à seqüência de polipeptídeos.

15 Mutações em seqüência de aminoácidos e em seqüência de ácido nucléico podem ser feitas por qualquer uma de várias técnicas, como conhecido na técnica. Em modalidades particularmente preferidas, as mutações são introduzidas em seqüências parentais por meio de PCR (reação de cadeia polimerase) usando iniciadores apropriados. Em algumas modalidades,
20 as enzimas parentais são modificadas ao nível de aminoácidos, enquanto em outras modalidades, as enzimas são modificados ao nível de ácido nucléico, a fim de gerar as seqüências como aqui descrito. Em algumas modalidades preferidas, a presente invenção provê a geração de compostos por introdução de uma ou mais mudanças de códons correspondentes na seqüência nucleotídica codificando um composto. Será notado que as mu-
25 danças de códon irão encontrar uso em várias seqüências de ácido nucléico da presente invenção. Por exemplo, em algumas modalidades, mudanças de seqüências são feitas em qualquer uma das seqüências homólogas, como aqui descrito.

30 Como indicados acima, em algumas modalidades, o "composto" compreende a proteína "completa", (isto é, em seu comprimento completo, como ocorre em natureza (ou como mudado)), enquanto em outras modali-

dades, ele compreende uma forma truncada de uma proteína. Assim, os compostos da presente invenção são ou truncados ou de "comprimento completo". Além disso, em algumas modalidades, a truncagem está localizada na extremidade N-terminal, enquanto em outras modalidades, a truncagem está localizada na extremidade C-terminal da proteína. Em outras modalidades, o composto falta uma ou mais porções (por exemplo, subsequências, seqüências de sinal, domínios ou porções), ou ativo ou não.

Em ainda outras modalidades alternativas, as seqüências nucleotídicas codificando os compostos são preparadas sinteticamente por métodos padrões estabelecidos (por exemplo, o método fosforoamidito descrito por Beucage *et al.*, *Tetrahedr. Lett.*, 22:1859-1869 [1981]; ou o método descrito por Matthes *et al.*, *EMBO J.*, 3:801-805 [1984]). No método fosforoamidito, oligonucleotídeos são sintetizados (por exemplo, em um sintetizador de DNA automático), purificado, anelado, ligado e clonado em vetores apropriados.

Em algumas modalidades da presente invenção, as seqüências nucleotídicas são ou de origem genômica mista ou sintética, origem de cDNA e sintética mista e origem de cDNA e genômico mista, preparadas por ligação de fragmentos de origem de cDNA ou genômico, sintético, de acordo com técnicas padrões. Cada fragmento ligado corresponde a várias partes da seqüência nucleotídica completa. Em algumas modalidades, a seqüência de DNA é preparada por reação de cadeia polimerase (PCR) usando iniciadores específicos, como conhecido na técnica.

Em algumas modalidades, as seqüências nucleotídicas, descritas aqui, e apropriadas para uso nos métodos e composições descritos aqui, incluem em si mesmas nucleotídeos sintéticos ou modificados. Vários tipos diferentes de modificação para oligonucleotídeos são conhecidos na técnica. Estes incluem, mas não são limitados a, estruturas dorsais de metilfosfonato e fosforotioato e/ou a adição de cadeias acridina ou polilisina nas extremidades 3' e/ou 5' da molécula. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer método particular, como quaisquer métodos apropriados conhecidos dos versados para modificar as seqüências nucleo-

tídicas encontram uso na presente invenção. Em algumas modalidades, estas modificações são realizadas a fim de melhorar a atividade e/ou extensão de vida *in vivo* das seqüências nucleotídicas.

Em algumas modalidades preferidas, a presente invenção provê
5 seqüências nucleotídicas e métodos para usar seqüências nucleotídicas que são complementares às seqüências apresentadas aqui, assim como derivados e/ou fragmentos destas seqüências.

Em algumas modalidades, os polinucleotídeos da presente invenção encontram uso na produção de iniciadores e/ou sondas. Assim, em
10 algumas modalidades, as seqüências polinucleotídicas são usadas para produzir iniciadores de PCR, iniciadores para outros métodos de amplificação, como conhecido na técnica, sondas rotuladas, e/ou para métodos de clonagem. Em modalidades preferidas, estes iniciadores, sondas e outros fragmentos tem pelo menos 15, preferivelmente pelo menos 20, e em algu-
15 mas modalidades mais preferíveis, pelo menos 25, 30 ou 40 nucleotídeos. Além disso, estes iniciadores, sondas e fragmentos são englobados pelo termo "polinucleotídeo".

Em algumas modalidades, polinucleotídeos como polinucleotídeos DNA e sondas são produzidos recombinantemente, enquanto em ou-
20 tras modalidades, eles são produzidos sinteticamente. Em modalidades adicionais, estas seqüências são clonadas usando métodos padrões. Em geral, iniciadores são produzidos por meios sintéticos, envolvendo uma fabricação em etapas da seqüência de ácido nucléico desejada, um nucleotídeo de cada vez. Técnicas para alcançar isto, usando técnicas automatizadas são prontamente disponíveis na técnica. No entanto, não se pretende que a pre-
25 sente invenção seja limitada à produção de polinucleotídeos usando qualquer método particular, como qualquer método apropriado conhecido dos versados encontra uso na presente invenção.

Em algumas modalidades, polinucleotídeos mais longos são
30 geralmente produzidos usando meios recombinantes, por exemplo usando técnicas de clonagem PCR, como conhecidos na técnica. Em tais modalidades, os iniciadores são tipicamente projetados para conter sítios de reconhe-

cimento de o enzima de restrição apropriados, de modo que o DNA amplificado pode ser prontamente clonado em um vetor de clonagem apropriado. Preferivelmente, as seqüências variantes são pelo menos tão biologicamente ativas como as seqüências apresentadas aqui.

5 Em algumas modalidades preferidas, seqüências que são providas que são complementares ao composto ou seqüências que são capazes de hibridizar para as seqüências nucleotídicas dos compostos (incluindo seqüências complementares das aqui apresentadas), assim como seqüências nucleotídicas que são complementares a seqüências que podem hibridizar
10 em seqüências nucleotídicas dos compostos (incluindo seqüências complementares das aqui apresentadas). Em algumas modalidades preferidas, as seqüências polinucleotídicas que são capazes de hibridizar para as seqüências nucleotídicas apresentadas aqui sob condições de estringência intermediário a máxima são providas.

15 Em algumas modalidades preferidas, seqüências nucleotídicas que podem hibridizar na seqüência nucleotídica de um composto de ácido nucléico, ou o seu complemento, sob condições estringentes (por exemplo, 50°C e 0,2xSSC) são providas. Mais preferivelmente, as seqüências nucleotídicas podem hibridizar na seqüência nucleotídica do composto, ou o seu
20 complemento, sob condições mais altamente estringentes (por exemplo 65°C e 0,1xSSC).

 Em algumas modalidades, é desejável mudar a seqüência a fim de para preparar um composto. Assim, em algumas modalidades, mutantes são preparados a partir dos compostos aqui providos. Em algumas modalidades, mutações são introduzidas usando oligonucleotídeos sintéticos. Estes oligonucleotídeos contém seqüências nucleotídicas flanqueando os sítios de mutação desejados. Várias métodos conhecidos na técnica encontram
25 uso nesta modalidade (Ver por exemplo, Morinaga *et al.*, *Biotechnol.*, 2:646-649 [1984]; Nelson e Long, *Anal. Biochem.*, 180:147-151 [1989]; e Sarkar e Sommer, *Biotechn.*, 8:404-407 [1990]). No entanto, métodos adicionais encontram uso na presente invenção e não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer método particular.
30

Em algumas modalidades preferidas, as seqüências usadas nos métodos e composições como aqui descrito incluem uma seqüência recombinante (isto é, a seqüência que foi preparada usando técnicas de DNA recombinante produzido usando qualquer método apropriado conhecido na técnica.

Em modalidades adicionais, a presente invenção provê vetores compreendendo o composto, células compreendendo o composto, e métodos de expressar o composto. Em algumas modalidades, as seqüências nucleotídicas usadas nos métodos e composições como aqui descritos são incorporadas em um vetor replicável recombinante. Em algumas modalidades, o vetor é usado para replicar e expressar a seqüência nucleotídica, em forma de enzima, em e/ou a partir de uma célula hospedeira compatível. Em algumas modalidades, expressão é controlada usando seqüências de controle (por exemplo, seqüências regulatórias). Em algumas modalidades, proteínas produzidas pela célula hospedeira por expressão da seqüência nucleotídica são secretadas (isto é, dentro do meio de crescimento), enquanto em outras modalidades, as proteínas estão contidas intracelularmente dentro da célula hospedeira. Em algumas modalidades, as seqüências de codificação são projetadas para incluir seqüências de sinal que dirigem a seção das seqüências codificando substâncias através de uma membrana de células procaríóticas e eucarióticas particular. Em outras modalidades, polinucleotídeos são incorporados em um vetor replicável recombinante. Em modalidades adicionais, o vetor é usado para replicar o ácido nucléico em uma célula hospedeira compatível. Em modalidades preferidas, o vetor compreendendo a seqüência polinucleotídica é transformado em uma célula hospedeira apropriada. Apesar de qualquer hospedeiro apropriado encontrar uso na presente invenção, em algumas modalidades preferidas, os hospedeiros são selecionados dentre o grupo consistindo em células bacterianas, leveduras, de insetos, de fungos e de mamíferos.

Em algumas modalidades, compostos e seus polinucleotídeos são expressados por introdução de um polinucleotídeo em um vetor replicável, introduzindo o vetor em uma célula hospedeira compatível, e cultivando

a célula hospedeira sob condições que ocasionam a replicação do vetor. Em algumas modalidades, o vetor é recuperado da célula hospedeira.

Em modalidades adicionais, o composto ácido nucléico é ligado operativamente a elementos regulatórios transcricionais e translacionais ativos na célula hospedeira. Em algumas modalidades, o composto ácido nucléico também codifica uma proteína de fusão compreendendo pelo menos uma seqüência de sinal (por exemplo, as derivadas do gene glucoamilase de *Schwanniomyces occidentalis*, de um gene de tipo trançado de fator α de *Saccharomyces cerevisiae* e a TAKA-amilase de *Aspergillus oryzae*). Em outras modalidades alternativas, o composto ácido nucléico codifica uma proteína de fusão compreendendo um domínio de ligação de membrana.

Em algumas modalidades preferidas, o composto é expressado nos níveis desejados em um organismo hospedeiro usando um vetor de expressão. Contempla-se que qualquer vetor de expressão compreendendo um composto ácido nucléico que é capaz de expressar o gene codificando o composto ácido nucléico no organismo hospedeiro selecionado irá encontrar uso na presente invenção. A escolha de vetor depende da célula hospedeira em que ele deve ser introduzido. Assim, em algumas modalidades, o vetor é um vetor replicando autonomamente (isto é, um vetor que existe como uma entidade epissomal, cuja replicação é independente de replicação cromossômica, como, por exemplo, um plasmídeo, um bacteriófago ou um elemento epissomal, um minicromossomo ou um cromossomo artificial). Alternativamente, em algumas modalidades, o vetor integra no genoma da célula hospedeira e replica junto com o cromossomo.

Em algumas modalidades preferidas, o vetor de expressão inclui os componentes de um vetor de clonagem, incluindo mas não limitados a tais componentes como um elemento que permite a replicação autônoma do vetor no organismo hospedeiro selecionado e um ou mais marcadores fenotipicamente detectáveis para fins de seleção. Em modalidades preferidas, o vetor de expressão ainda compreende seqüências nucleotídicas de controle codificando um promotor, operador, sítio de ligação de ribossomas, sinal de iniciação de tradução, e opcionalmente, um gene repressor ou um ou mais

genes ativadores. Adicionalmente, em algumas modalidades, o vetor de expressão compreende uma seqüência codificando para uma seqüência de aminoácidos capazes de marcar o composto em uma organela da célula hospedeira como um peroxissoma ou em um compartimento de célula hospedeira particular. Esta seqüência de marcação inclui mas é não limitada a uma seqüência SKL. Para expressão sob a direção de seqüências de controle, a seqüência de ácido nucléico codificando o composto é ligada operativamente às seqüências de controle em um modo apropriado com relação à expressão.

Em algumas modalidades preferidas, o polinucleotídeo em um vetor é ligado operativamente a uma seqüência de controle que é capaz de prover a expressão da seqüência de codificação pela célula hospedeira (isto é, o vetor é um vetor de expressão). Em algumas modalidades, as seqüências de controle são modificadas (por exemplo, pela adição de outros elementos regulatórios transcricionais) a fim de tornar o nível de transcrição dirigido pelas seqüências de controle mais respondentes aos moduladores transcricionais. Em algumas modalidades preferidas, as seqüências de controle compreendem promotores.

Em algumas modalidades preferidas dos vetores, a seqüência de ácido nucléico codificando para o composto é combinada operativamente com uma seqüência de promotor apropriada. O promotor pode ser qualquer seqüência de DNA tendo atividade de transcrição no organismo hospedeiro de escolha e pode ser derivado de genes que são homólogos ou heterólogos ao organismo hospedeiro. Exemplos de promotores apropriados para dirigir a transcrição da seqüência nucleotídica modificada, como compostos ácidos nucléicos, em um hospedeiro bacteriano incluem, mas não são limitados ao promotor do operon *lac* de *E. coli*, os promotores *dagA* do gene agarase de *Streptomyces coelicolor*, os promotores do gene α -amilase de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), o promotor *aprE* de *Bacillus subtilis*, os promotores do gene amilase maltogênica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), os promotores do gene α -amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), os promotores dos genes *xylA* e *xylB* de *Bacillus subtilis* e um promotor derivado de um promo-

tor derivado de *Lactococcus* sp. incluindo o promotor PI70. Quando o gene codificando o composto é expressado em uma espécie bacteriana como *E. coli*, um promotor apropriado pode ser selecionado, por exemplo, de um promotor de bacteriófago incluindo um promotor T7 e um promotor de fago lambda. Para transcrição em uma espécie de fungos, exemplos de promotores utilizáveis são os derivados dos genes codificando a TAKA amilase de *Aspergillus oryzae*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, α -amilase neutral de *A. niger*, α -amilase estável em ácido de *A. niger*, glucoamilase de *A. niger*, lipase de *Rhizomucor miehei*, protease alcalina de *A. oryzae*, triose fosfato isomerase de *A. oryzae*, e acetamidase de *A. nidulans*. Exemplos de promotores apropriados para a expressão em uma espécie de leveduras incluem mas não são limitados aos promotores Gal 1 e Gal 10 de *Saccharomyces cerevisiae* e aos promotores de *Pichia pastoris* AOX1 ou AOX2.

Exemplos de organismos hospedeiros bacterianos apropriados são espécies Gram positivas, incluindo, mas não limitadas a membros das espécies de *Bacillaceae*, (por exemplo, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alcalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. lautus*, *B. megaterium* e *B. thuringiensis*), espécies de *Streptomyces* (por exemplo, *S. murinus* e *S. lividans*), bactérias de láctico ácido (por exemplo, *Lactococcus* spp. como *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus* spp. incluindo *Lactobacillus reuteri*; *Leuconostoc* spp.; *Pediococcus* spp.; e *Streptococcus* spp. Alternativamente, cepas de espécies Gram-negativas pertencendo aos membros de *Enterobacteriaceae* (por exemplo, *E. coli*) ou de *Pseudomonadaceae* encontram uso na presente invenção.

Em algumas modalidades, um organismo hospedeiro de levedura apropriado é selecionado dentre várias espécies de leveduras biotecnologicamente utilizáveis, incluindo mas não limitadas a *Pichia* sp., *Hansenula* sp ou *Kluyveromyces*, *Yarrowinia*, *Saccharomyces* (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*), *Schizosaccharomyces* (por exemplo, *S. pombe*). Em algumas modalidades, cepas das espécies de leveduras metilotróficas *Pichia pastoris* são usadas com o organismo hospedeiro, enquanto em outras modalidades, o organismo hospedeiro é uma espécie *Hansenula*. Os organismos hospe-

deiros apropriados dentre os fungos filamentosos incluem espécies de *Aspergillus* (por exemplo, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. tubigensis*, *A. awamori* e *Aspergillus nidulans*). Alternativamente, cepas de *Fusarium* espécies (por exemplo *F. oxisporum*) e *Rhizomucor* (por exemplo, *Rhizomucor miehei*) encontram uso como organismo hospedeiro. As cepas adicionais apropriadas incluem, mas não são limitadas a espécies de *Thermomyces* e *Mucor*.

Em algumas modalidades preferidas, células hospedeiras compreendendo polinucleotídeos são usados para expressar polipeptídeos, como os compostos descritos aqui, fragmentos, homólogos, variantes ou seus derivados. Células hospedeiras são cultivadas sob condições apropriadas que permitem a expressão das proteínas. Em algumas modalidades, expressão dos polipeptídeos é constitutiva (isto é, os peptídeos são continuamente produzidos), enquanto em outras modalidades, expressão é indutível. Nos casos de expressão indutível, a produção de proteínas é iniciada quando requerido por adição de uma substância indutora ao meio de cultura (por exemplo, dexametasona ou IPTG). Polipeptídeos podem ser extraídos de células hospedeiras por uma variedade de técnicas conhecidos na técnica, incluindo enzimática, química e/ou lise osmótica e ruptura física. De fato, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer meio particular de coleta de polipeptídeos expressados.

Em modalidades alternativas, polipeptídeos são produzidos recombinantemente em qualquer sistema isento de células *in vitro* apropriado (incluindo comercialmente disponível), como o sistema de reticulócito de coelhos TnT[®] (Promega).

Em modalidades preferidas adicionais, a presente invenção provê composições cosméticas e/ou farmacêuticas compreendendo pelo menos um polipeptídeo ou peptídeo, como especificado aqui, e um veículo ou excipiente fisiologicamente aceitável. Preferivelmente, o composto está presente em uma quantidade de cerca de 0,0001% a cerca de 5% em peso, com base no peso total da composição. Também preferivelmente, o composto está presente em uma quantidade de cerca de 0,001% a cerca de 0,5% em peso com base no peso total da composição. Composição pode estar na forma de

um veículo emulsificado, como um creme ou loção nutriente, um gel estabilizado ou sistema de dispersão, um soro de tratamento, um sistema de distribuição lipossomal, uma máscara ou porção tópica, um sistema de limpeza à base de tensoativos como um xampu ou líquido de limpeza corporal, uma dispersão ou emulsão aerossolizada ou pulverizada, um condicionador da pele ou cabelo, auxiliar de penteado, ou um produto pigmentado como maquiagem. Preferivelmente, o veículo é pelo menos um composto selecionado dentre o grupo consistindo em água, propileno glicol, etanol, propanol, glicerol, butileno glicol e polietileno glicol.

10 Em algumas modalidades lipossomais, os lipossomas compreendem água e um ou mais ingredientes capazes de formar vesículas de bicamadas de lipídeos que podem manter um ou mais ingredientes ativos ou funcionais. Exemplos não limitativos de ingredientes capazes de formar vesículas de bi-camadas de lipídeos incluem: fosfolipídeos, fosfatidilcolina hidrogenada, lecitina, colesterol e esfingolipídeos. Os lipossomas preferidos

15 incluem, sem limitação : a) lipossoma lipóide 0003 (composto de água e lecitina e glicerina); b) lipossoma lipóide 0300 (composto de água e fosfatidilcolina); c) lipossoma lipóide 0111 (composto de água, extrato de folha de *Ginkgo biloba*, álcool desnaturado, lecitina hidrogenada e colesterol); d) lipossomas antiirritantes (composto de água, extrato de semente de cola acuminata, bisabolol e fosfolipídeos); e) lipossomas de vitamina C e E (compostos de água, fosfolipídeos, acetato tocoferila e palmitato de ascorbila); f) lipossomas firmadores (compostos de água, butileno glicol, extrato de fruta *pyrus malus* (maçã), fosfolipídeos, acetato de tocoferila e carbomero); e g)

20 lipossomas umectantes (compostos de água, sódio PCA, acetato de tocoferila, goma de xantano, arginina, lisina, glicina e prolina).

25

Em outras modalidades, a composição de cuidado pessoal da presente invenção ainda compreende pelo menos um ingrediente ativo além dos suportes "scaffold" aqui providos. Existem numerosos ingredientes ativos como conhecido dos versados na técnica que encontram uso nas composições de cuidado pessoal da presente invenção. De fato, contempla-se

30 que qualquer ingrediente ativo apropriado ou combinação de ingredientes

ativos apropriados irá encontrar uso na presente invenção (Ver por exemplo, McCutcheon's Functional Materials, Edições Norte-Americana e Internacional, publicado por MC Publishing Co. [2003]). Por exemplo, em algumas modalidades, as composições de cuidado pessoal aqui compreendem um ingrediente ativo de cuidado da pele a um nível de cerca de 0,0001% a cerca de 20%, em peso da composição. Em outra modalidade, as composições de cuidado pessoal compreendem um ingrediente ativo de cuidado da pele de cerca de 0,001% a cerca de 5%, em peso da composição. Em ainda outra modalidade, as composições de cuidado pessoal compreendem um ingrediente ativo de cuidado da pele de cerca de 0,01% a cerca de 2%, em peso da composição.

Exemplos não limitativos de ingredientes ativos ou funcionais que pode ser liberados via lipossomas incluem: vitaminas e seus derivados, antioxidantes, proteínas e peptídeos, agentes queratolíticos, bioflavinóides, terpenóides, fitoquímicos, e extratos de plantas, de origem marinha ou fermentada. Em uma modalidade preferida, a composição ainda compreende um ativo para o cuidado da pele ou cuidado do cabelo. Ingredientes ativos podem incluir qualquer um dentre uma ampla variedade de ingredientes como são conhecidos na técnica. (Ver por exemplo, McCutcheon's Functional Materials, Edições Norte-Americana e Internacional, (2003), publicado por MC Publishing Co.). Preferivelmente, estes ativos incluem mas não são limitados a antioxidantes, como derivados de tocoferila e ascorbila, bioflavinóides, terpenóides, sintéticos e e outros, vitaminas e derivados de vitamina, ácidos hidroxil- e polihidróxi e seus derivados, como AHAs e BHAs e seus produtos de reação, peptídeos e polipeptídeos e seus derivados, como glicopeptídeos e peptídeos liofilizados, proteínas de choque térmico e citocinas, enzimas e inibidores de enzimas e seus derivados, como proteases, inibidores de MMP, catalases, glicose oxidase e superóxido dismutase, aminoácidos e seus derivados, produtos de fermentação de levedura, bactérias e fungos e seus derivados, incluindo cogumelos, algas e algas marinhas e seus derivados, fitoesteróis e extratos de plantas e de partes de plantas e seus derivados e fosfolipídeos e seus derivados, agentes anticaspa como

piritiona de zinco e sistemas de distribuição contendo os mesmos, como aqui provido e/ou conhecido na técnica.

Em algumas modalidades preferidas, o ativo para o cuidado da pele é selecionado dentre o grupo consistindo em um componente de Vitamina B3, pantenol, vitamina E, acetato de vitamina E, retinol, propionato de retinila, palmitato de retinila, ácido retinóico, vitamina C, teobromo, alfa-hidróxi ácido, farnesol, fitrantriol, ácido salicílico, palmitil peptapeptídeo-3 e suas misturas. Em algumas modalidades preferidas, o componente de vitamina B3 é niacinamida. Em algumas modalidades, as composições providas aqui compreendem um ativo para o cuidado da pele a um nível de cerca de 0,0001% a cerca de 20%, preferivelmente de cerca de 0,001% a cerca de 5%, mais preferivelmente de cerca de 0,01% a cerca de 2%, em peso.

Derivados exemplares dos compostos de vitamina B3 acima incluem ésteres de ácido nicotínico, incluindo ésteres não vasodilatadores de ácido nicotínico, aminoácidos de nicotinila, ésteres de álcool nicotinílico de ácidos carboxílicos, N-óxido de ácido nicotínico e N-óxido de niacinamida. Os ésteres de ácido nicotínico apropriados incluem ésteres de ácido nicotínico de álcoois C₁-C₂₂, preferivelmente C₁-C₁₆, mais preferivelmente C₁-C₆. Nestas modalidades, os álcoois são de modo apropriado de cadeia reta ou cadeia ramificada, cíclicos ou acíclicos, saturados ou insaturados (incluindo aromáticos), e substituídos ou não substituídos. Os ésteres são preferivelmente não vasodilatadores.

Os ésteres de ácido nicotínico não vasodilatadores incluem nicotinato de tocoferol e hexanicotinato de inositol; nicotinatos de tocoferol são preferidos. A descrição mais completa de compostos de vitamina B3 é provida em WO 98/22085. Os de compostos vitamina B3 preferidos incluem niacinamida e nicotinato de tocoferol.

Em modalidades adicionais, o ativo de cuidado da pele compreende pelo menos um retinóide. O retinóide é preferivelmente retinol, ésteres de retinol (por exemplo, ésteres de C₂ - C₂₂ alquila retinol, incluindo palmitato de retinila, acetato de retinila, propionato de retinila), retinal, e/ou ácido retinóico (incluindo ácido retinóico todo-trans e/ou ácido 13-cis- retinóico),

mais preferivelmente retinóides diferentes de ácido retinóico. Estes compostos são bem-conhecidos na técnica e são comercialmente disponíveis de várias fontes (por exemplo, Sigma e Boehringer Mannheim). Retinóides preferidos incluem retinol, palmitato de retinila, acetato de retinila, propionato de retinila, retinal, ácido retinóico e suas combinações. Mais preferidos são retinol, propionato retinóico, ácido retinóico e palmitato de retinila. Em algumas modalidades, o retinóide é incluído como um material substancialmente puro, enquanto em outras modalidades, ele é provido como um extrato obtido por isolamento físico e/ou químico apropriado de fontes naturais (por exemplo, plantas). Quando um retinóide é incluído nas composições aqui, ele preferivelmente compreende de cerca de 0,005% a cerca de 2%, preferivelmente de cerca de 0,01% a cerca de 1% retinóide. Retinol é preferivelmente usado em uma quantidade de cerca de 0,01% a cerca de 0,15%; ésteres de retinol são preferivelmente usados em uma quantidade de cerca de 0,01% a cerca de 2% (por exemplo, cerca de 1%).

Em algumas modalidades, as composições da presente invenção compreendem quantidades efetivas e seguras de um veículo dermatologicamente aceitável que é apropriado para aplicação tópica à pele ou cabelo com os materiais essenciais e outros materiais opcionais são incorporados para permitir que os materiais essenciais e componentes opcionais sejam liberados na pele ou cabelo em uma concentração apropriada. Assim, em algumas modalidades, o veículo atua como um diluente, dispersante, solvente ou e outros para os componentes essenciais, assegurando que estes componentes podem ser aplicados e distribuídos uniformemente sobre o alvo selecionado em uma concentração apropriada.

Em outras modalidades, uma quantidade efetiva de um ou mais compostos como aqui descrito também deve ser incluída em composições a serem aplicadas a materiais queratinosos, como unhas e cabelo, incluindo mas não limitadas aos utilizáveis como composições de pulverização no cabelo, composições para modelar o penteado do cabelo, composições de lavagem com xampu e/ou condicionamento do cabelo, composições aplicadas com o fim de regular o crescimento de cabelo e composições aplicadas ao

cabelo e couro cabeludo com o fim de tratar seborréia, dermatite e/ou caspa.

Em outras modalidades adicionais, uma quantidade efetiva de um ou mais compostos como aqui descritos é incluída em composições apropriadas para aplicação tópica à pele ou cabelo. Estas composições são providas em qualquer forma apropriada, incluindo mas não limitadas a cremes, loções, géis, suspensões dispersões, microemulsões, nanodispersões, microesferas, hidrogéis, emulsões (por exemplo, óleo-em-água e água –em-óleo, assim como emulsões múltiplas), e géis multilaminares e outros (Ver por exemplo, Schlossman *et al.*, The Chemistry and Manufacture of Cosmetics, [1998], incorporado por referência, aqui). Em algumas modalidades, as composições são formuladas como composições aquosas de silicone, enquanto em outras modalidades elas são formuladas como emulsões de uma ou mais fases de óleo em uma fase contínua aquosa(ou uma fase aquosa em uma fase de óleo).

O tipo de veículo utilizado na presente invenção depende do tipo de forma de produto desejada para a composição. O veículo pode ser sólido, semi-sólido ou líquido. Os veículos apropriados incluem líquidos, semi-sólidos (por exemplo, cremes, loções, géis, bastões, ungüentos, e pastas), pulverizações e espumas. Preferivelmente o veículo está na forma de uma loção, creme ou um gel, mais preferivelmente um que tem a espessura suficiente ou ponto de conformação para evitar que as partículas sedimentem. Em algumas modalidades, o veículo é inerte, enquanto em outras modalidades, ele proporciona benefícios dermatológicos. Em algumas modalidades, o veículo é aplicado diretamente à pele e/ou cabelo, enquanto em outras modalidades, ele é aplicado via um pano ou tecido ou não tecido. Em ainda outras modalidades, ele está na forma de um curativo, máscara ou envoltório. Em ainda outras modalidades, ele é aerossolizado ou de outra forma pulverizado ou bombeado na pele e/ou cabelo. O veículo escolhido é fisicamente e quimicamente compatível com os componentes essenciais, como aqui descrito, e não deve prejudicar indevidamente a estabilidade, eficácia ou outros benefícios de uso associados com as composições da presente invenção.

Os veículos preferidos contêm um diluente hidrofílico dermatologicamente aceitável. Os diluentes hidrofílicos apropriados incluem água, diluentes hidrofílicos orgânicos como álcoois monoídricos $C_2 - C_{10}$, preferivelmente $C_2 - C_6$, preferivelmente, $C_3 - C_6$ e glicóis e polióis de baixo peso molecular, incluindo propileno glicol, polietileno glicol, polipropileno glicol, glicerol, butileno glicol, 1,2,4-butanotriol, ésteres de sorbitol, 1,2,6-hexametriol, pentileno glicol, hexileno glicol, ésteres de sorbitol, éteres etoxilados, éteres propoxilados, e suas combinações. O diluente é preferivelmente líquido. Água é um diluente preferido. Composição preferivelmente compreende pelo menos cerca de 20% do diluente hidrofílico.

Em algumas modalidades, veículos apropriados também compreendem uma emulsão compreendendo uma fase hidrofílica, especialmente uma fase aquosa, e uma fase hidrofóbica (por exemplo, um lipídeo, óleo ou material oleoso). Como bem-conhecido dos versados na técnica, a fase hidrofílica é dispersa na fase hidrofóbica, ou vice versa, para formar respectivamente fases dispersas ou contínuas hidrofílicas ou hidrofóbicas, dependendo da composição de ingredientes. O termo "fase dispersa" é um termo bem-conhecido de um versados na técnica de tecnologia de emulsão, usado em referência à fase que existe como partículas pequenas ou gotículas que são colocadas em suspensão em e circundadas por uma fase contínua. A fase dispersa é também conhecida como a fase interna ou descontínua. A emulsão pode ser ou compreender (por exemplo, *em* emulsão de fase tripla ou outra múltipla) uma emulsão óleo-em-água ou uma emulsão água -em-óleo, como uma emulsão água -em-silicone. As emulsões óleo-em-água tipicamente compreendem de cerca de 1% a cerca de 60% (preferivelmente cerca de 1% a cerca de 30%) da fase hidrofóbica dispersa e de cerca de 1% a cerca de 99% (preferivelmente de cerca de 10% a cerca de 90%) da fase hidrofílica contínua, enquanto emulsões água -em-óleo tipicamente compreendem de cerca de 1% a cerca de 98% (preferivelmente de cerca de 40% a cerca de 90%) da fase hidrofílica dispersa e de cerca de 1% a cerca de 50% (preferivelmente cerca de 1% a cerca de 30%) da fase hidrofóbica contínua.

Em outras modalidades, o veículo também inclui um ou mais

componentes que facilitam a penetração através da barreira do estrato córneo superior aos níveis inferiores da pele. Exemplos de melhoradores da penetração incluem, mas não são limitados a, propileno glicol, azona, etoxidiglicol, dimetil isosorbídeo, uréia, etanol e sulfóxido de dimetila, assim como

5 microemulsões, lipossomas e nanoemulsões.

Em algumas formas adicionais de realização, as composições da presente invenção compreendem umectantes, que estão preferivelmente presentes em um nível de cerca de 0,01% a cerca de 20%, preferivelmente de cerca de 0,1% a cerca de 15% e preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 10%. Os umectantes preferidos incluem, mas não são limitados a,

10 compostos selecionados dentre álcoois poliídricos, sorbitol, glicerol, uréia, betaína e, D-pantenol, DL-pantenol, pantotenato de cálcio, geléia real, pantetina, pantoteína, pantenil etil éter, ácido pangâmico, piridoxina, complexo pantoil lactose Vitamina B, ácido carboxílico pirrolidona sódica, hexano - 1,

15 2, 6, - triol, guanidina ou seus derivados, e suas misturas.

Os álcoois poliídricos apropriados para uso aqui incluem, mas não são limitados a polialquilenos glicóis e preferivelmente alquilenos polióis e seus derivados, incluindo propileno glicol, dipropileno glicol, polipropileno glicol, polietileno glicol e seus derivados, sorbitol, hidroxipropil sorbitol, eritritol, treitol, pentaeritritol, xilitol, glucitol, manitol, pentileno glicol, hexileno glicol, butileno glicol (por exemplo, 1,3-butileno glicol), hexano triol (por exemplo, 1,2,6-hexanotriol), trimetilol propano, neopentil glicol, glicerina, glicerina etoxilada, propano-1,3 diol, glicerina propoxilada e suas misturas. Os

20 derivados alcóxilados de qualquer um dos acima álcoois poliídricos são também apropriados para uso aqui. Os álcoois poliídricos preferidos da presente invenção são selecionado dentre glicerina, butileno glicol, propileno glicol, pentileno glicol, hexileno glicol, dipropileno glicol, polietileno glicol, hexano triol, glicerina etoxilada e glicerina propoxilada e suas misturas.

25

Os umectantes apropriados utilizáveis aqui são 2-pirrolidona-5-carboxilato de sódio (NaPCA), guanidina; ácido glicólico e sais glicolatos (por exemplo, alquila de amônio e amônio quaternário); ácido láctico e sais lactato (por exemplo, alquila de amônio e amônio quaternário); aloe vera (babó-

30

sa) em qualquer uma de suas várias formas (por exemplo, gel de aloe vera); ácido hialurônico e seus derivados (por exemplo, derivados de sal como hialuronato de sódio); lactamida monoetanolamina; acetamida monoetanolamina; uréia; betaína e, pantenol e seus derivados; e suas misturas.

- 5 Em algumas modalidades, pelo menos parte (até cerca de 5% em peso de composição) de um umectante são incorporados nas composições da presente invenção na forma de uma mistura com um copolímero acrilato ou metacrilato reticulado, hidrofóbico, particulado, ele mesmo preferivelmente presente em uma quantidade de cerca de 0,1% a cerca de 10%,
10 que pode ser adicionada ou na fase aquosa ou dispersa. Este copolímero é particularmente valioso para reduzir o brilho e controlar o óleo enquanto ajudando a prover benefícios de umectação eficazes e é descrito em maiores detalhes em WO96/03964, incorporado aqui por referência.

- Em algumas modalidades, as composições óleo-em-água e água
15 - em-óleo da presente invenção compreendem de cerca de 0,05% a cerca de 20%, preferivelmente de cerca de 1% a cerca de 15%, preferivelmente de cerca de 2% a cerca de 10%, preferivelmente de cerca de 2% a cerca de 5% de um emoliente dermatologicamente aceitável. Emolientes tendem a lubrificar a pele, aumentar a suavidade e flexibilidade da pele, evitar ou aliviar a secura da pele e/ou proteger a pele. Emolientes são tipicamente materiais imiscíveis água, óleos ou ceras e emolientes podem conferir propriedades estéticas a uma composição tópica. Uma ampla variedade de emolientes apropriados é conhecida (Ver por exemplo, Sagarin, Cosmetics, Science and Technology, 2a. Ed., Vol. 1, pp. 32-43 [1972]; e WO 00/24372), e encontram
20 uso aqui, contém numerosos exemplos de materiais apropriados como emolientes. Emolientes adicionais incluem, mas não são limitados aos seguintes:

- i) hidrocarbonetos de cadeia reta e ramificados tendo de cerca de 7 a cerca de 40 átomos de carbono, como óleos minerais, dodecano, esqualano, colesterol, poliiisobutileno hidrogenado, isohexadecano, isoeicosano, isooctahexacontano, isohexapentacontahectano, e as C₇-C₄₀ isoparafinas, que são hidrocarbonetos C₇-C₄₀ ramificados. Os hidrocarbonetos de
30

cadeia ramificada apropriados para uso aqui são selecionados dentre isopentacontaoctano, petrolato e suas misturas;

ii) ésteres de ácido graxo C_1 - C_{30} de C_1 - C_{30} ácidos carboxílicos, C_{12-15} benzoatos de alquila e de C_2 - C_{30} ácidos dicarboxílicos, por exemplo isononanoato de isononila, neopentanoato de isoestearila, octanoato de isodecila, isononanoato de isodecila, isononanoato de tridecila, octanoato de miristila,, pelargonato de octila, isononanoato de octila, miristila de miristato, neopentanoato de miristila, octanoato de miristila, miristato de isopropila, propionato de miristila, estearato de isopropila, isostearato de isopropila, isostearato de metila, beenato de beenila, maleato de dioctila, adipato de diisopropila, e dilinoleato de diisopropila e suas misturas também encontram uso na presente invenção;

iii) C_1 - C_{30} mono- e poli- ésteres de açúcares e materiais relacionados. Estes ésteres são derivado de um açúcar ou porção poliol e uma ou mais porções de ácido carboxílico. Dependendo do ácido e açúcar constituintes, estes ésteres podem estar em forma líquida ou sólida em temperatura ambiente. Exemplos incluem: tetraoleato de glicose, os galactose tetraésteres de ácido oléico, o sorbitol tetraoleato, tetraoleato de sacarose, pentaoleato de sacarose, hexaoleato de sacarose, heptaoleato de sacarose, octaoleato de sacarose, sorbitol hexaéster. Outros materiais incluem ésteres de ácido graxo de óleo de soja ou óleo de semente de algodão de sacarose. Outros exemplos de tais materiais são descritos em WO 96/16636, incorporado por referência aqui;

iv) Óleos vegetais e óleos vegetais hidrogenados. Exemplos de óleos vegetais e óleos vegetais hidrogenados incluem óleo de cártamo, óleo de semente de uva, óleo de coco, óleo de semente de algodão, óleo de menhaden, óleo de caroço de palma, óleo de palma, óleo de amendoim, óleo de soja, óleo de semente de colza, óleo de linhaça, óleo de farelo de arroz, óleo de pinheiro, óleo de nozes, óleo de sésamo, óleo de semente de girassol, óleo de óleos parcialmente e completamente hidrogenados das fontes acima e suas misturas;

v) Agentes umectantes solúveis ou coloidalmente solúveis. E-

xemplos incluem ácido hialurônico e sulfato de condroitina.

Em algumas modalidades, as composições da presente invenção contém um emulsificante e/ou tensoativo, geralmente para ajudar a dispersar e colocar em suspensão a fase dispersa dentro da fase aquosa contínua. Um tensoativo também pode ser utilizável se o produto se destinar para limpeza da pele ou cabelo. Por conveniência aqui abaixo, "emulsificantes" são englobados pelo termo "tensoativos." Assim, como usado aqui, o termo "tensoativo(s)" refere-se a agentes ativos na superfície, ou usados como emulsificantes ou para outros fins tensoativos como limpeza da pele. Tensoativos conhecidos, incluindo os convencionais, encontram uso na presente invenção, desde que o agente selecionado seja quimicamente e fisicamente compatível com componentes essenciais da composição e prover as características desejadas (Ver por exemplo, WO 00/24372). Tensoativos apropriados incluem materiais derivados não silicone, materiais derivados de silicone, e suas misturas.

Em outras modalidades, as composições da presente invenção compreendem preferivelmente de cerca de 0,05% a cerca de 30%, mais preferivelmente de cerca de 0,5% a 15%, e o mais preferivelmente de cerca de 1% a 10% de um tensoativo ou mistura de tensoativos. O tensoativo ou mistura de tensoativos exatos escolhidos depende do pH da composição, ou outros componentes presentes e a estética do produto final desejada.

Dentre os tensoativos não iônicos que são utilizáveis aqui estão os que podem ser amplamente definidos como produtos de condensação de álcoois de cadeia longa (por exemplo, C₈-30 álcoois), com polímeros de amido ou açúcar (por exemplo, glicosídeos). Outros tensoativos não iônicos utilizáveis incluem os produtos de condensação de óxidos de alquilenos com ácidos graxos (isto é, ésteres de óxido de alquilenos de ácidos graxos). Estes materiais tem a fórmula geral $\text{RCO}(\text{X})_n\text{OH}$ em que R é um grupo C₁₀-30 alquila, X é -OCH₂CH₂- (isto é, derivado de etileno glicol ou óxido) ou -OCH₂CHCH₃- (isto é, derivado de propileno glicol ou óxido) e n é um inteiro de cerca de 6 a cerca de 200. Outros tensoativos não iônicos são os produtos de condensação de óxidos de alquilenos com 2 moles de ácidos graxos

(isto é, diésteres de óxido de alquilenos de ácidos graxos). Estes materiais tem a fórmula geral $\text{RCO(X)}_n\text{OOCR}$ em que R é um grupo C_{10-30} alquila, X é $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ (isto é, derivado de etileno glicol ou óxido) ou $-\text{OCH}_2\text{CHCH}_3-$ (isto é, derivado de propileno glicol ou óxido) e n é um inteiro de cerca de 6 a 100. Em algumas modalidades, um emulsificante para uso aqui é preferivelmente uma mistura de éster de ácido com base em uma mistura de éster de ácido graxo sorbitano e éster de ácido graxo de sacarose, especialmente uma mistura de estearato de sorbitano e cocoato de sacarose. Outros exemplos apropriados incluem uma mistura de álcoois cetearílicos e glucosídeos de cetearila. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer emulsificante particular, como vários emulsificantes apropriados são conhecidos na técnica.

Em modalidades adicionais, os tensoativos hidrofílicos utilizáveis aqui alternativamente ou adicionalmente incluem qualquer uma dentre uma ampla variedade de tensoativos catiônicos, aniônicos, zwitteriônicos, e anfotéricos, como são conhecidos na técnica (vide, por exemplo, McCutcheon's, Emulsifiers and Detergents, Edições Norte-Americana e Internacional, MC Publishing Co. [2003]; patente US Nº 5.011.681 patente US Nº 4.421.769; e patente US Nº 3.755.560).

Vários tensoativos aniônicos são também utilizáveis aqui (Ver por exemplo, patente US Nº 3.929.678). tensoativos aniônicos exemplares incluem, mas não são limitados a isetonatos de alcoila (por exemplo, $\text{C}_{12} - \text{C}_{30}$), alquila e éter sulfatos de alquila e seus sais, alquila e fosfatos de alquil éter e seus sais, tauratos de alquil metila (por exemplo, $\text{C}_{12} - \text{C}_{30}$), e sabões (por exemplo, sais de alquilamina e de metal alcalino substituídos, por exemplo, sais de sódio ou potássio) de ácidos graxos.

Tensoativos anfotéricos e zwitteriônicos são também utilizáveis aqui. Exemplos de tensoativos anfotéricos e zwitteriônicos preferido que encontram uso nas composições da presente invenção são os que são amplamente descritos como derivados de aminas alifáticas secundárias e terciárias em que o radical alifático pode ser de cadeia reta ou ramificada e em que um dos substituintes alifáticos contém de cerca de 8 a cerca de 22 áto-

mos de carbono (preferivelmente C₈ - C₁₈) e um contém um grupo aniônico solubilizante em água (por exemplo, carbóxi, sulfonato, sulfato, fosfato, ou fosfonato). Exemplos, incluem mas não são limitados a acetatos de alquil imino e iminodialcanoatos e aminoalcanoatos, imidazolínio e derivados de amônio. Outros tensoativos anfotéricos e zwitteriônicos apropriados são os selecionados dentre o grupo consistindo em betaínas, sultainas, hidroxissultainas, e sarcosinatos de alcanoíla ramificados e não ramificados, e suas misturas.

Em outras modalidades, algumas emulsões da presente invenção incluem um emulsificante contendo silicone ou tensoativo. Uma ampla variedade de emulsificantes de silicone encontram uso aqui. Estes emulsificantes de silicone são organopolissiloxanos tipicamente organicamente modificados, também conhecidos dos versados na técnica como tensoativos de silicone. Os emulsificantes de silicone utilizáveis incluem, mas não são limitados a dimeticona copolióis. Estes materiais são polidimetil siloxanos que foram modificados para incluir cadeias laterais de poliéter, como cadeias de óxido de polietileno, cadeias de óxido de polipropileno, misturas destas cadeias e cadeias de poliéter contendo porções derivadas de tanto óxido de etileno como óxido de propileno. Outros exemplos incluem dimeticona copolióis modificados por alquila (isto é, compostos que contém C₂-C₃₀ cadeias laterais pendentes. Ainda outros dimeticona copolióis utilizáveis incluem materiais tendo várias porções pendentes catiônicas, aniônicas, anfotéricas, e zwitteriônicas.

Em algumas modalidades, as composições da presente invenção compreendem pelo menos um agente espessante polimérico. Os agentes espessantes poliméricos utilizáveis aqui preferivelmente têm um peso molecular médio numérico maior do que cerca de 20.000, mais preferivelmente maior do que cerca de 50.000, e o mais preferivelmente maior do que cerca de 100.000. Em algumas modalidades, as composições da presente invenção compreendem de cerca de 0,01% a cerca de 10%, preferivelmente de cerca de 0,1% a cerca de 8% e mais preferivelmente de cerca de 0,2% a cerca de 5% em peso da composição do agente espessante polimérico ou

suas misturas.

Os agentes espessantes poliméricos preferidos para uso aqui incluem, mas não são limitados a mais do que agentes não iônicos e agentes espessantes aniônicos ou suas misturas. Os agentes espessantes não iônicos apropriados incluem, mas não são limitados a polímeros poliacrilamida, poli(N-vinil pirrolidonas) reticuladas, polissacarídeos, gomas naturais ou sintéticas, polivinil pirrolidona e álcool polivinílico. Os agentes espessantes aniônicos apropriados incluem, mas não são limitados a copolímeros de ácido acrílico/acrilato de etila, polímeros e copolímeros reticulados de carboxivinila de éteres de alquil vinila e anidrido maleico. Espessantes comercialmente disponíveis (por exemplo, Carbopol; Noveon) encontram uso em algumas modalidades da presente invenção. As resinas apropriadas Carbopol pode ser hidrofobicamente modificadas, e outras resinas apropriadas são descritas em WO98/22085, ou suas misturas.

Em algumas modalidades, as presentes composições compreendem pelo menos uma fase de óleo silicone. As fases de óleo(s) silicone geralmente compreendem de cerca de 0,1% a cerca de 20%, preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 10%, e mais preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 5%, da composição. A fase óleo de silicone preferivelmente compreende um ou mais componentes de silicone.

Em algumas modalidades, componentes de silicones são fluidos, incluindo silicones de cadeia reta, ramificados e cíclicos. Os fluidos de silicone apropriados utilizáveis aqui incluem silicones inclusive fluidos de polialquil siloxano, fluidos de poliaril siloxano, polialquilsiloxanos cíclicos e lineares, silicones polialcoxilados, silicones modificados de amino e amônio quaternário, polialquilaril siloxanos ou um copolímero poliéter siloxano e suas misturas. Fluidos de silicone voláteis, assim como não voláteis encontram uso aqui. Fluidos de silicone geralmente têm um peso molecular médio de menos do que cerca de 200.000. Em modalidades preferidas, fluidos de silicone apropriados tem um peso molecular de cerca de 100.000 ou menos, preferivelmente cerca de 50.000 ou menos, e mais preferivelmente cerca de 10.000 ou menos. Preferivelmente o fluido de silicone é selecionado dentre

fluidos de silicone tendo um peso molecular médio ponderal na faixa de cerca de 100 a cerca de 50.000 e preferivelmente de cerca de 200 a cerca de 40.000. Tipicamente, fluidos de silicone tem uma viscosidade na faixa de cerca de 0,65 a cerca de 600.000 mm^2s^{-1} , preferivelmente de cerca de 0,65 a cerca de 10.000 mm^2s^{-1} a 25°C. A viscosidade pode ser medida por meio de um viscosímetro capilar de vidro, como especificado em método de teste da Dow Corning Corporate CTM0004, 29 de julho de 1970. Polidimetil siloxanos apropriados que podem ser usados aqui incluem compostos comercialmente disponíveis (por exemplo, da General Electric Company e Dow Corning). Também são utilizáveis polialquilarilsiloxanos essencialmente não voláteis, por exemplo, polimetilfenilsiloxanos, tendo viscosidades de cerca de 0,65 a 30.000 mm^2s^{-1} a 25°C (General Electric Company ou de Dow Corning). Polidimetilsiloxanos cíclicos apropriados para uso aqui são os tendo uma estrutura de anel incorporando de cerca de 3 a cerca de 7 porções $(\text{CH}_3)_2\text{SiO}$, preferivelmente cerca de 5 ou mais.

Em modalidades adicionais, gomas de silicone encontram uso aqui. Em algumas modalidades preferidas, uma fase óleo de silicone compreende uma goma de silicone ou a mistura de silicones incluindo a goma de silicone. Tipicamente, gomas de silicone têm uma viscosidade a 25°C em excesso de cerca de 1.000.000 mm^2s^{-1} . As gomas de silicone incluem dimeticonas, como conhecidos na técnica (Ver por exemplo, Patente US Nº 4.152.416; e Noll, Chemistry and Technology of Silicones, Academic Press, New York [1968]). Gomas de silicone como as descritas em General Electric Silicone Rubber Products Data Sheets SE 30, SE 33, SE 54 e SE 76, também encontram uso na presente invenção. Exemplos específicos de gomas de silicone incluem polidimetilsiloxano, copolímero (polidimetilsiloxano) (metilvinil siloxano), copolímero poli(dimetilsiloxano)(difênil)(metilvinil siloxano) e suas misturas. Preferidas gomas de silicone para uso aqui são gomas de silicone tendo um peso molecular de cerca de 200.000 a cerca de 4.000.000 selecionadas dentre dimeticonol, dimeticona copoliol, dimeticona e suas misturas.

Em algumas modalidades, uma fase de silicone aqui preferivel-

mente compreende uma goma de silicone incorporada na composição como parte de uma mistura goma de silicone-fluido. Quando a goma de silicone é incorporada como parte de uma goma de mistura silicone-fluido, a goma de silicone preferivelmente constitui de cerca de 5% a cerca de 40%, especialmente de cerca de 10% a 20% em peso da mistura de goma de silicone-fluido. As misturas apropriadas de goma de silicone-fluido aqui são misturas consistindo essencialmente de:

(i) um silicone tendo um peso molecular de cerca de 200.000 a cerca de 4.000.000 selecionado dentre dimeticonol, fluorossilicone e dimeticona e suas misturas; e

(ii) um veículo que é um fluido de silicone, o veículo tendo uma viscosidade de cerca de $0,65 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ a cerca de $100 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$,

em que a relação de i) a ii) é de cerca de 10:90 a cerca de 20:80 e em que referido componente à base de goma de silicone tem uma viscosidade final de cerca de $100 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ a cerca de $100.000 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$, preferivelmente de $500 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ a cerca de $10.000 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$.

Outros componentes de silicone apropriados para uso em uma fase de óleo de silicone aqui incluem polímeros poliorganossiloxano reticulados, opcionalmente dispersos em um veículo fluido. Em geral, quando presentes, os polímeros poliorganossiloxano reticulados, juntos com seu veículo (se presentes) compreendem de cerca de 0,1% a cerca de 20%, preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 10%, e mais preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 5% da composição. Estes polímeros compreendem polímeros poliorganossiloxano reticulados por um agente de reticulação (Ver por exemplo, WO98/22085). Exemplos de polímeros poliorganossiloxano apropriados para uso aqui incluem, mas não são limitados a metil vinil dimeticona, metil vinil difenil dimeticona e metil vinil fenil metil difenil dimeticona.

Outra classe de componentes de silicone apropriados para uso em uma fase de óleo silicone fase inclui copolímeros polidiorganossiloxano-polioxialquileno contendo pelo menos um segmento polidiorganossiloxano e pelo menos um segmento polioxialquileno (Ver por exemplo, WO98/22085). Copolímeros polidiorganossiloxano-polialquileno apropriados são disponíveis

comercialmente sob os nomes comerciais BELSIL® de Wacker-Chemie GmbH. Uma mistura de fluido de copolímero particularmente preferida para uso aqui inclui Dow Corning DC3225C que tem a designação CTFA Dimeticona/Dimeticona copoliol.

5 Em outras modalidades, composições da presente invenção compreendem um filtro solar orgânico. Em algumas modalidades, filtros solares apropriados têm propriedades de absorção de UVA, enquanto outros têm propriedades absorventes de UVB, e ainda outros compreendem uma mistura dos mesmos. A quantidade exata do ativo do filtro solar varia, dependendo do fator de proteção solar desejado (isto é, abreviado "FPS") da composição, assim como o nível desejado de proteção de UV. FPS é uma medida comumente usada de fotoproteção de um filtro solar contra eritema. O FPS é definido como uma relação da energia de ultravioleta requerida para produzir eritema mínimo sobre a pele protegida à requerida para produzir o mesmo eritema mínima em uma pele não protegida no mesmo indivíduo. Quantidades do filtro solar usados são preferivelmente de cerca de 2% a cerca de 20%, e mais preferivelmente de cerca de 4% a cerca de 14%. Filtros solares apropriados incluem, mas não são limitados aos aprovados para uso nos Estados Unidos, Japão, Europa e Austrália. As composições da presente invenção preferivelmente compreendem um FPS of cerca de 2 a cerca de 30, preferivelmente cerca de 4 a cerca de 30, e mais preferivelmente cerca de 4 a cerca de 15.

 Em algumas modalidades, as composições da presente invenção compreendem um ou mais ativos de filtro solar absorvedores de UVA que absorvem radiação UV tendo um comprimento de onda de cerca de 320nm a cerca de 400nm. Os apropriados ativos de filtro solar absorvedores de UVA incluem, mas não são limitados a derivados de dibenzoilmetano (Ver por exemplo, Lowe e Shaath (eds.), Sunsceens: Development, Evaluation and Regulatory Aspects, Marcel Dekker, Inc.) derivados antranilato como metilantranilato e homometila, 1-N-acetilantranilato, e suas misturas. O ativo de filtro solar absorvedor de UVA está preferivelmente presente em uma quantidade suficiente para prover proteção UVA de espectro amplo ou inde-

pendentemente, ou em combinação com outros ativos protetores de UV que pode estar presentes na composição.

Os ativos de filtro solar Uva apropriados incluem ativos de filtro solar dibenzoilmetano e seus derivados. Eles incluem, mas não são limitados aos selecionados dentre 2-metildibenzoilmetano, 4-metildibenzoilmetano, 4-isopropildibenzoilmetano, 4-terc-butildibenzoilmetano, 2, 4-dimetildibenzoilmetano, 2, 5-dimetildibenzoilmetano, 4, 4'-diisopropilbenzoilmetano, 4-(1,1-dimetiletil)-4'-metoxidibenzoilmetano, 2-metil-5-isopropil-4'-metoxidibenzoilmetano, 2-metil-5-terc-butil-4'-metóxi-dibenzoilmetano, 2, 4-dimetil-4'-metoxidibenzoilmetano, 2, 6-dimetil-4'-terc-butil-4'-metoxidibenzoilmetano, e suas misturas. Os ativos de filtro solar de dibenzoil preferidos incluem os selecionados dentre 4-(1, 1-dimetiletil)-4'-metoxidibenzoilmetano, 4-isopropildibenzoilmetano, e suas misturas. Um ativo de filtro solar preferido é 4-(1, 1-dimetiletil)-4'-metoxidibenzoilmetano.

O ativo de filtro solar 4-(1, 1-dimetiletil)-4'-metoxidibenzoilmetano, que é também conhecido como metoxidibenzoilmetano de butila ou "avobenzona", é comercialmente disponível sob os nomes de Parsol® 1789 de Givaudan Roure (International) S. A., e Eusolex® 9020 de Merck & Co., Inc. O filtro solar 4-isopropildibenzoil metano, que é também conhecido como isopropildibenzoil metano, é comercialmente disponível de Merck sob o nome de Eusolex® 8020.

Em algumas modalidades, as composições da presente invenção ainda incluem um ou mais ativos de filtro solar UVB que absorve (m) radiação UV tendo um comprimento de onda de cerca de 290 nm a cerca de 320 nm. As composições compreendem uma quantidade do ativo de filtro solar UVB que é segura e efetiva em prover proteção contra UVB ou independentemente, ou em combinação com outros ativos protetores de UV que podem estar presentes nas composições. As composições compreendem de cerca de 0,1% a cerca de 20%, preferivelmente de cerca de 0,1% a cerca de 12%, e mais preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 8% em peso, de cada filtro solar orgânico absorvendo UVB, ou como regulado pelas autoridades relevantes.

Vários ativos de filtro solar UVB são apropriados para uso aqui (Ver por exemplo, Pat U.S. Nº 5,087,372; Pat. U.S. Nº 5,073,371; Patente US Nº 5,073,372; Patente US Nº 4,937,370; e Patente US Nº 4,999,186). Ativos de filtro solar UVB preferidos são selecionados dentre 2-etilhexil-2-ciano-3, 2-etilhexil N,N-dimetil-p-aminobenzoato, ácido p-aminobenzóico, oxibenzona, salicilato de homomentila, salicilato de octila, 4,4'-metóxi-t-butil dibenzoil metano, 4-isopropil dibenzoil metano, 3-benzilideno cânfora, 3-(4-metilbenzilideno) cânfora, 3-difenilacrilato, ácido 2-fenil-benzimidazol-5-sulfônico (PBSA), ésteres de cinamato e seus derivados como 2-etilhexil-p-metoxicinamato, ésteres de salicilato e seus derivados como salicilato de trietanolamina, salicilato de etilhexila, ácido octildimetil para-aminobenzóico, derivados de cânfora e seus derivados, e suas misturas. Ativos de filtro solar orgânicos preferidos incluem 2-etilhexil-2-ciano-3, 3-difenilacrilato, ácido 2-fenil-benzimidazol-5-sulfônico (PBSA), octil-p-metoxicinamato, e suas misturas. As formas de sal e ácido neutralizadas dos filtros solares ácidos são também utilizáveis aqui.

Em algumas modalidades, pelo menos um agente é adicionado a qualquer uma das composições utilizáveis na presente invenção para estabilizar o filtro solar UVA para evitar que ele fotodegrade em exposição a radiação UV e assim mantenha sua eficácia de proteção UVA. Uma ampla faixa de compostos são relatados como tendo estas propriedades estabilizantes e devem ser escolhidos para complementar tanto o filtro solar UVA como a composição como um todo (Ver por exemplo, Patentes US Nos 5.972.316; 5.968.485; 5.935.556; 5.827.508; e WO 00/06110). Preferidos exemplos de agentes estabilizantes para uso na presente invenção incluem 2-etilhexil-2-ciano-3, 3-difenilacrilato, etil-2-ciano-3, 3-difenilacrilato, 2-etilhexil-3, 3-difenilacrilato, etil-3, 3-bis(4-metoxifenil)acrilato, dietilhexil 2,6 naftalato e suas misturas (Symrise Chemical Company).

Em algumas modalidades, pelo menos um agente é adicionado a qualquer uma das composições utilizáveis na presente invenção para melhorar a substantividade da pele destas composições, particularmente para melhorar sua resistência a ser removida por lavagem com água ou esfrega-

da. Exemplos incluem, mas não são limitados a, copolímeros acrilato/C₁₂₋₂₂ alquilmetacrilato, copolímero acrilato/acrilato, dimeticona, dimeticonol, enxerto-copoli (dimetilsiloxano/ metacrilato de i-butila), lauril dimeticona, copolímero PVP/exadecano, copolímero PVP/eicoseno, tricontanil PVP e trimetoxisiloxisilicato.

Além dos filtros solares orgânicos, em algumas modalidades, as composições da presente invenção adicionalmente compreendem bloqueadores solares físicos inorgânicos (Ver por exemplo, TFA International Cosmetic Ingredient Dictionary, 6^a Ed., pp. 1026-28 e 1103 [1995]; Sayre *et al.*, J. Soc. Cosmet. Chem., 41:103-109 [1990]; e Lowe *et al.*, *supra*). Os bloqueadores solares físicos inorgânicos preferidos incluem óxido de zinco e dióxido de titânio e suas misturas.

Quando usados em modalidades preferidas, os bloqueadores solares físicos estão presentes em uma quantidade tal que as presentes composições são transparentes sobre a pele (isto é, não branqueamento), preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 20%, preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 10%, e mais preferivelmente de cerca de 0,5% a 5% em peso. Quando dióxido de titânio é usado, ele pode ter uma estrutura anatase, rutila ou amorfa. Os fabricantes de dióxido de titânio e óxido de zinco de tipo micronizado para uso em filtro solar incluem, mas não são limitados a Tayca Corporation, Uniqema, Shinetsu Chemical Corporation, Kerr-McGee, Nanofase, Nanofonte, Sachtleben, Elementis, e BASF Corporation, assim como seus agentes de distribuição e as empresas que ainda processam o material para uso em filtro solar. As partículas de bloqueador solar físicas (por exemplo, dióxido de titânio e óxido de zinco) podem ser não revestidas ou revestidas com vários materiais incluindo mas não limitadas a aminoácidos, compostos de alumínio como alumina, estearato de alumínio, laurato de alumínio, e similares; ácidos carboxílicos e seus sais (por exemplo, ácido esteárico e seus sais); fosfolipídeos, como lecitina; compostos de silicone orgânicos; compostos de silicone inorgânicos, como sílica e silicatos e misturas dos mesmos. Em algumas modalidades preferidas, as composições da presente invenção compreendem de cerca de 0,1% a cerca de 15%, preferi-

velmente de cerca de 0,1% a cerca de 7%, e mais preferivelmente de cerca de 0,5% a cerca de 5%, em peso, de filtro solar inorgânico.

Em algumas modalidades preferidas, a composição da presente invenção também inclui conservantes. Estes conservantes incluem, mas não são limitados a pentileno glicol, tetraacetato de etileno diamina (EDTA) e seus sais, clorhexidina (e seus derivados diacetato, di-cloridrato, digluconato), 1,1,1-tricloro-2-metil-2-propanol, paracloro metaxilenol, cloridrato de polihexametilenobiguanida, ácido desidroacético, diazolidinil uréia, álcool 2,4-dicloro benzílico, 4,4-dimetil-1,3-oxazolidina, formaldeído (por exemplo, solução aquosa a 37%, com 10-15% metanol para evitar polimerização), glutaraldeído, dimetilidantoína, imidazolidinil uréia, 5-cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona, orto-fenilfenol, ésteres de ácido 4-hidroxibenzóico (por exemplo, "parabeno") e seus ésteres de metila, etila, propila, isopropila, butila, e isobutila, triclosano, 2-fenoxietanol, acetato fenil mercuríco, borato, nitrato, quaternio-15, salicilato, ácido salicílico e seus sais, cálcio, sorbato de cálcio, ácido sórbico e seus sais, iodopropanil butil carbamato zinco piritiona, álcool benzílico, 5-bromo-5nitro-1,3-dioxano, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, ácido benzóico e seus sais, sulfitos, bissulfitos, fenoxietanol, cloroxilenol, diazolidinil uréia, metilparabenos, propilparabenos, isopropilparabenos, isobutil parabenos, butil parabenos, etilparabeno, fenoxietanol PG, e cloreto de benzalcônio.

Vários ingredientes opcionais como agentes neutralizantes, perfumes e agentes solubilizantes de perfume, e agentes colorantes, também encontram uso em algumas das composições aqui. Prefere-se que quaisquer ingredientes adicionais melhorem os benefícios de flexibilidade/suavidade do produto. Além disso, prefere-se que qualquer tal ingrediente não impacte de modo negativo as propriedades estéticas do produto.

Outros materiais opcionais incluem agentes ceratolíticos, assim como conservantes solúveis em água e/ou solubilizáveis preferivelmente a um nível de cerca de 0,1% a cerca de 5% (por exemplo, Germall 115, ésteres de metila, etila, propila e butila de ácido hidroxibenzóico, álcool benzílico, DMDM hidantoína iodopropanil butil carbanato, disponíveis sob o nome co-

comercial Glydant Plus de Lonza; EDTA, EUXYL® K400, Bromopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) e fenoxipropanol); antibacterianos (por exemplo, IRGASAN®) e fenoxietanol (preferivelmente em níveis de cerca de 0,1% a cerca de 5%); assim como agentes umectantes solúveis ou coloidalmente solúveis, como ácido hialurônico, sulfato de condroitina, e poliacrilatos de sódio enxertados com amido (por exemplo, SANWET® IM-1000, IM-1500 e IM-2500, disponíveis de Celanese Superabsorbent Materials, Portsmouth, VA, Vide por exemplo, Patente US Nº 4,076,663; vitaminas como vitamina A, vitamina C, vitamina E e seus derivados e seus blocos de constructo, como fitantriol, e vitamina K e seus, como o álcool graxo dodecatrienol; alfa e beta hidroxiácidos; aloe vera; esfingosinas e fitoesfingosinas, colesterol; agentes de branqueamento da pele; N-acetil cisteína; agentes colorantes; agentes antibacterianos, como TCC/TCS, também conhecidos como triclosano e triclorocarbono; perfumes e solubilizantes de perfume. Exemplos de ácidos alfa hidróxi incluem ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, ácido cítrico, ácido glicólico em conjunto com glicolato de amônio, ácido alfa-hidróxi etanóico, ácido alfa-hidroxi octanóico, ácido alfa-hidroxicaprílico, ácido hidroxicaprílico, ácido de frutas mistas, ácidos trialfa hidróxi de frutas, ácidos triplos de frutas, extrato de cana de açúcar, alfa hidróxi e plantas medicinais, ácido l-alfa hidróxi e glicômero em ácidos graxos reticulados (por exemplo, alfa nutrium). Exemplos preferidos de ácidos alfa hidróxi são ácido glicólico e ácido láctico. Prefere-se que ácidos alfa hidróxi sejam usados em níveis de até cerca de 10%. Não se pretende que a presente invenção seja limitada a qualquer composto particular derivado de qualquer fonte particular, como qualquer composto aditivo apropriado, ou obtidos de fontes naturais ou através de síntese nos laboratórios encontram uso na presente invenção.

Outros materiais opcionais incluem conservantes solúveis em água ou solubilizáveis, preferivelmente a um nível de cerca de 0,1% a cerca de 5% cada, como Germall 115, ésteres de metila, etila, propila e butila de ácido hidroxibenzóico, álcool benzílico, DMDM hidantoína iodopropanil butil carbanato disponíveis sob o nome comercial Glydant Plus de Lonza, EDTA, Euxyl (RTM) K400, Bromopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol), pentileno

glicol e fenoxipropanol; antibacterianos como Irgasan (RTM) e fenoxietanol (preferivelmente em níveis de 0,1% a cerca de 5%). Agentes antibacterianos como TCC/TCS, também conhecidos como triclosano e triclorocarbono são também utilizáveis em composições da presente invenção.

5 Agentes neutralizantes apropriados para uso em neutralização de grupos ácidos contendo agentes gelificantes hidrofílicos aqui incluem hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de amônio, monoetanolamina, dietanolamina, amino metil propanol, tampão tris e trietanolamina.

Outros materiais opcionais que encontram uso na presente invenção incluem qualquer um dentre os numerosos ingredientes ativos e/ou funcionais conhecidos dos versados na técnica (Vide por exemplo, McCutcheon's Functional Materials, Edições Norte-Americana e Internacional, MC Publishing Co. [2003]) Como indicado acima, exemplos não limitativos incluem agentes queratolíticos; agentes umectantes solúveis ou coloidalmente solúveis, como ácido hialurônico e sulfato de condroitina; vitaminas como
10 vitamina A, vitamina C, vitamina E, vitamina K e seus derivados e seus blocos de constructo; fitantriol; álcoois graxos como dodecatrienol; alfa e beta hidroxiácidos; aloe vera; esfingosinas e fitoesfingosinas, colesterol; agentes de branqueamento da pele; N-acetil cisteína; agentes de coloração. Exemplos de ácidos alfa hidróxi incluem ácido glicólico, ácido láctico, ácido málico, e ácido cítrico (ou derivados sinteticamente ou de fontes naturais ou usados
15 sozinhos ou em combinação) e seus ésteres ou combinações tamponadas relevantes. Outros exemplos de ácidos alfa-hidróxi incluem: ácido alfa-hidróxi etanóico, ácido alfa-hidroxiocetanóico, ácido alfa-hidroxicaprílico, e
20 ácido hidroxicaprílico. Preferidos exemplos de ácidos alfa hidróxi incluem ácido glicólico e ácido láctico. Prefere-se que os ácidos alfa hidróxi sejam usados em níveis de até cerca de 10%.

 Materiais opcionais incluem pigmentos que, quando insolúveis em água, contribuem para e são incluídos no nível total de ingredientes de
30 óleo de fase. Pigmentos apropriados para uso nas composições da presente invenção podem ser orgânicos e/ou inorgânicos. Também estão incluídos dentro do termo "pigmento" os materiais tendo uma tonalidade de cor ou lus-

tro fraco, como agentes de acabamento fosco, agentes de difusão de luz, e auxiliares de formulação como micas, seracitas, e sais de carbonato. Outros exemplos de pigmentos apropriados incluem dióxido de titânio, óxidos de ferro, óxidos de glutamato de ferro, óxido de zinco, oxicleto de bismuto, azul ultramarinho (todos estes podendo ser ou pré-dispersos e/ou pre-revestidos ou não) corantes e lacas D&C, cores FD&C, aditivos de cor natural como carmine, e suas misturas. Dependendo do tipo de composição, a mistura de pigmentos é geralmente usada em modalidades preferidas da presente invenção. Pigmentos preferidos para uso aqui do ponto de vista de umectação, tato da pele, aparência da pele e compatibilidade da emulsão são pigmentos tratados. Em algumas modalidades, os pigmentos são tratados com compostos, incluindo mas não limitados a aminoácidos, silicones, lecitina e óleos de éster.

Em modalidades preferidas, o pH das composições aqui está na faixa de cerca de 3,5 a cerca de 10, preferivelmente de cerca de 4 a cerca de 8, e mais preferivelmente de cerca de 5 a cerca de 7, em que o pH da composição final é ajustado por adição de sais de tampão ácido, ou básico, como necessário, dependendo da composição das formas e as exigências de pH dos compostos.

As composições da presente invenção são preparadas por técnicas padrões bem-conhecidas dos versados na técnica. Em geral, a fase aquosa e/ou a fase óleo são preparadas separadamente, com materiais de divisão de fase similares sendo adicionados em qualquer ordem. Se o produto final for uma emulsão, as duas fases são então combinadas com agitação vigorosa e/ou homogeneização, como necessário, para reduzir o tamanho das gotículas de fase interna. Quaisquer ingredientes na formulação com volatilidade elevada, ou que são susceptíveis à hidrólise ou decomposição em temperaturas elevadas, são adicionados com agitação suave em direção ao final do processo, pós-emulsificação se aplicável. A frequência de dosagem irá depender dos critérios de desempenho desejados.

Em algumas modalidades da presente invenção, métodos de diminuir a atividade de VEGF são providos. Nestas modalidades, os méto-

dos compreendem aplicar a um organismo em necessidade do mesmo uma quantidade efetiva de qualquer um dos compostos aqui especificados. Em modalidades preferidas adicionais, a presente invenção provê compostos para o tratamento de um organismo em necessidade do mesmo, incluindo

5 humanos e outros animais.

Experimental

Os seguintes exemplos servem para ilustrar certas modalidades preferidas e aspectos da presente invenção e não devem ser construídos como limitando o escopo dos mesmos.

- 10 Na descrição experimental que segue, as seguintes abreviações aplicam-se: PI (inibidor de proteinase), BBI (inibidor de Bowman-Birk), STI (inibidor de tripsina de óleo de soja); ppm (partes por milhão); VEGF e VegF (fator de crescimento endotelial vascular); M (molar); mM (milimolar); μ M (micromolar); nM (nanomolar); mol (moles); mmol (milimoles); μ mol (micro-
- 15 mols); nmol (nanomoles); g (gramas); mg (miligramas); μ g (microgramas); pg (picogramas); L (litros); ml e mL (mililitros); μ l e μ L (microlitros); cm (centímetros); mm (milímetros); μ m (micrometros); nm (nanômetros); U (unidades); V (volts); PM (peso molecular); s (segundos); min(s) (minuto/minutos); h(s) (hora/horas); °C (graus centígrados); QS (quantidade suficiente); ND (não feito);
- 20 SA (vide capaz (não aplicável); rpm (revoluções por minuto); H₂O (água); dH₂O (água deionizada); HCl (ácido clorídrico); aa (aminoácido); bp (par de bases); kb (par de quilobase); kD (kilodáltons); cDNA (DNA complementar ou cópia); DNA (ácido dessoxirribonucléico); ssDNA (DNA filamento único); dsDNA (DNA filamento duplo); dNTP (trifosfato dessoxirribonucleotídeo);
- 25 RNA (ácido ribonucléico); MgCl₂ (cloreto de magnésio); NaCl (cloreto de sódio); p/v (peso para volume); v/v (volume para volume); g (densidade); OD (densidade óptica); A₄₀₅ (absorbância a 405 nm); V_{max} (a velocidade inicial máxima de uma reação catalisada por enzima); FGFR1(IIIc) (receptor FGF-5); solução tamponada de fosfato de Dulbecco (DPBS); SOC (2% de bacto-
- 30 triptona, 0,5% de extrato de levedura bacto, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl); Terrific Broth (TB; 12 g/l de bacto triptona, 24 g/l de glicerol, 2,31 g/l de KH₂PO₄, e 12,54 g/l de K₂HPO₄); OD₂₈₀ (densidade óptica a 280 nm); OD₆₀₀

(densidade óptica a 600 nm); PAGE (eletroforese de poliacrilamida gel); PBS (solução salina tamponada de fosfato [150 mM de NaCl, 10 mM de tampão de fosfato de sódio, pH 7,2]); PBST (PBS+0,25% Tween® 20); PEG (polietileno glicol); PCR (reação de cadeia polimerase); RT-PCR (PCR de transcrição inversa); SDS (dodecil sulfato de sódio); bME, BME e β ME (beta-mercaptoetanol ou 2-mercaptoetanol); Tris-HCl (cloridrato de tris [hidroximetil] aminometano); tricina (N-[tris-(hidroximetil)-metil]-glicina); CHES (ácido 2-(N-ciclo-hexilamino) etano-sulfônico); TAPS (ácido 3-[[tris-(hidroximetil)-metil]-amino]-propanossulfônico); ácido CAPS (3-(ciclohexilamino)-propanossulfônico); DMSO (sulfóxido de dimetila); DTT (1,4-ditio-DL-treitol); Glut e GSH (glutathiona reduzida); GSSG (glutathiona oxidada); TCEP (tris[2-carboxietil] fosfina); tris(tris(hidroximetil) aminometano); HEPES (ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N-[2-etanossulfônico]); HBS (solução salina tamponada de HEPES); SDS (dodecilsulfato de sódio); Tris-HCl (cloridrato de tris[hidroximetil] aminometano); Ci (curies) mCi (millicuries); μ Ci (microcuries); TLC (cromatografia de camada fina) O/W (óleo em emulsão de água); A/O (emulsão água em óleo); W/S (emulsão água em silício); emulsão selecionada (emulsão estabilizada com um composto sólido); hidrodispersão (formulações isentas de emulsificante); PIT (tecnologia de temperatura de inversão de fase usada para fabricar emulsões especiais); bastões (qualquer produto que é provido em um formiato de bastão, incluindo mas não limitado a batons, antiperspirantes, desodorizantes); Ts (tosila); Bn (benzila); Ph (fenila); Ms (mesila); Et (etila), Me (metila); Klenow (fragmento grande de DNA I polimerase (Klenow)); rpm (revoluções por minuto); EGTA (etileno glicol-bis(éter β -amino-etílico) ácido N, N, N', N'-tetraacético); EDTA (ácido etilenodiaminatetracético); bla (β -lactamase ou gene de resistência ampicilina); PDS (soro bovino derivado de plasma que foi dialisada para remover fatores de crescimento; diálise de plasma bovino desfibrinado é realizado contra DMEM durante cerca de 6 horas a 4°C, com agitação, o meio é mudado e a diálise é continuada durante a noite; o PDS dialisado é coletado após 24 horas, e estéril filtrado duas vezes através de um filtro de 0,2 μ m); FCS e FBS (soro de bezerro fetal); GE Healthcare (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom);

DNA2.0 (DNA2.0, Menlo Park, CA); OXOID (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK); Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co., Wicklow, Ireland); Corning (Corning Life Sciences, Corning, NY); (NEN (NEN Life Science Products, Boston, MA); Pharma AS (Pharma AS, Oslo, Norway); Dynal (Dynal, Oslo, Norway); Bio-Synthesis (Bio-Synthesis, Lewisville, TX); ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); Gibco/BRL (Gibco/BRL, Grand Island, NY); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Pharmacia (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ); NCBI (National Center for Biotechnology Information); Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA); Clontech (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, CA); Difco (Difco Laboratories, Detroit, MI); Oxoid (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY); GIBCO BRL ou Gibco BRL (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD); Millipore (Millipore, Billerica, MA); Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA); Invitrogen (Invitrogen Corp., San Diego, CA); NEB (New England Biolabs, Beverly, MA); Cambrex (Cambrex Bioproducts, East Rutherford, NJ); Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, IL); Takara (Takara Bio Inc. Otsu, Japan); Roche (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland); EM Science (EM Science, Gibbstown, NJ); Qiagen (Qiagen, Inc., Valencia, CA); Biodesign (Biodesign Intl., Saco, Maine); Biosource (Biosource, Intl., Camarillo, CA); Aptagen (Aptagen, Inc., Herndon, VA); Molecular Devices (Molecular Devices, Corp., Sunnyvale, CA); R&D Systems (R&D Systems, Minneapolis, MN); Stratagene (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA); Marsh (Marsh Biosciences, Rochester, NY); Bio-Tek (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT); (Biacore (Biacore, Inc., Piscataway, NJ); PeproTech (PeproTech, Rocky Hill, NJ); SynPep (SynPep, Dublin, CA); Chemicon (CHEMICON, Temecula, CA); Clinical Research Laboratories, (Clinical Research Laboratories, Inc., Piscataway, NJ); e Microsoft (Microsoft, Inc., Redmond, WA).

Exemplo 1

30 Composições de cuidado pessoal

Neste exemplo, várias composições de cuidado pessoal compreendendo qualquer um dos compostos da presente invenção são providas

- como a seguir. Nestas formulações, as quantidades são dadas como percentagens da composição total, salvo indicado em contrário. Também, salvo indicado em contrário nas seguintes formulações, a concentração de BBI-AV (referido como "composto" abaixo) nas faixas de cerca de 0,01% a cerca de 1,0%. Em algumas formulações, a concentração preferida está na faixa de cerca de 0,1% a cerca de 0,2%, enquanto em outras formulações, a concentração preferida está na faixa de cerca de 0,05% a cerca de 0,1% (por exemplo, para algumas modalidades de inibição de crescimento de cabelo); de cerca de 0,02 a 0,1% (por exemplo, para algumas modalidades clareamento da pele); de cerca de 0,5% a cerca de 1,0% (por exemplo, para algumas modalidades de clareamento pele); ou em concentrações maiores que cerca de 0,1% (por exemplo, para algumas modalidades de tratamento de rosácea). Os versados na técnica sabem como determinar a constructo apropriada (isto é ótima) de BBI-AV para cada produto.

15 Lavagem Corporal Umectante (pH 7)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água deionizada	QS
Glicerina	4,0
PEG-6 glicerídeos caprílico/cáprico	4,0
Ácidos graxos de caroço de palma	3,0
laureth-3 Sulfato de sódio	45,0
Cocamida MEA	3,0
Lauroanfoacetato de sódio	25,0
Óleo de soja	10,0
Poliquaternio-10	0,70
Conservante, fragrância, cor	QS
Composto	1000 ppm

Lavagem Corporal

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	pH 8	pH 6,5	pH 7
	Quantidade	Quantidade	Quantidade
Água deionizada	QS	QS	QS
Laureth sulfato de sódio	12	15	8
Cocamidopropil betaína	8	10	15
Glucosídeo de decila	0	2	1
Poliquaternio-10	0,25	0	0
Poliquaternio-7	0	0	0,7
Conservante, fragrância, cor	QS	QS	QS
Composto	250 ppm	500 ppm	1000 ppm

LOÇÃO CORPORAL

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	pH 7	pH 7	pH 7,5	pH 7
	Quantidade	Quantidade	Quantidade	Quantidade
Água deionizada	QS	QS	QS	QS
Glicerina	8	8	0	12
Isohexadecano	3	3	3	6
Niacinamida	0	3	5	6
Isoestearato de isopropila	3	3	3	3
Poliacrilamida (e) isoparafina (e) laureth-7	3	3	3	3
Petrolato	4	4	4	2
Náilon 12	2	2	2,5	2,5
Dimeticona	2	2	2,5	2,5
Sacarose óleo de polissemen- te de algodão	1,5	1,5	1,5	1,5
97% de álcool estearílico	1	1	1	1
Pantenol D	1	1	1	1
Acetato de DL-alfa tocoferol	1	1	1	1
95% de álcool cetílico	0,5	0,5	0,5	1

LOÇÃO CORPORAL	pH 7	pH 7	pH 7,5	pH 7
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade	Quantidade	Quantidade	Quantidade
Álcool beenílico	1	1	1	0,5
Álcool cetearílico (e) glucosídeo de cetearila	0,4	0,4	0,5	0,5
Ácido esteárico	0,15	0,15	0,15	0,15
PEG-100-estearato	0,15	0,15	0,15	0,15
Conservante, fragrância, cor	QS	QS	QS	QS
Compostos	250 ppm	500 ppm	750 ppm	1000 ppm

EMULSÃO DE PODER UMECTANTE **pH 7** **pH 7**
ULTRA-ELEVADO

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade	Quantidade
Água deionizada	QS	QS
Glicerina	12	5
PEG 400	0	10
Niacinamida	5	7
Isohexadecano	5	5
Dimeticona	3	2
Poliacrilamida (e) isoparafina (e) laureth-7	3	3
Isoestearato de isopropila	2	2
Polimetilsilsesquioxano	2	2
95% de álcool cetílico	1	1
Sacarose óleo de poliseamento de algodão	1	1
D-Pantenol	1	1
Acetato de tocoferol	1	1
95% de álcool estearílico	0,5	0,5
Glucosídeo de cetearila	0,5	0,5
Dióxido de titânio	0,3	0,3
Ácido esteárico	0,15	0,15

EMULSÃO DE PODER UMECTANTE**pH 7****pH 7****ULTRA-ELEVADO**

PEG-100-estearato	0,15	0,15
Conservante, fragrância, cor	QS	QS
Composto	250 ppm	100 ppm

CREME UMECTANTE**pH 7****pH 7****pH 7,5**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade	Quantidade	Quantidade
Água deionizada	QS	QS	QS
Glicerina	3	5	10
Petrolato	3	3	0
95% de álcool cetílico	1,5	1,5	1
Copoliol dimeticona	2	2	2
Palmitato de isopropila	1	1	0,5
Carbopol 954 (Noveon)	0,7	0,7	0,7
Dimeticona (350cs)	1	1	1
97% de álcool estearílico	0,5	0,5	1
Ácido esteárico	0,1	0,1	0,1
Peg-100-estearato	0,1	0,1	0,1
Dióxido de titânio	0,3	0,3	0,3
Conservante, cor, fragrância	QS	QS	QS
Composto	50 ppm	250 ppm	1000 ppm

EMULSÃO DE LIMPEZA FACIAL

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	69,05
EDTA dissódico	0,1
Polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol	1,0
Glicerina	2,0
Goma de xantano	0,5

EMULSÃO DE LIMPEZA FACIAL	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Hidroxietil celulose	0,5
Neopentanoato de tridecila	4,0
Estearato de isocetila	6,0
Palmitato de octila	8,0
Dilaurato de glicerila	4,0
Estearato de PEG-20	2,0
Estearato de glicerila (e) laureth-23	2,0
Lauril pirrolidona	0,5
Extrato de camomila	0,2
Aloe vera (babosa)(200x)	0,05
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

LIMPADOR FACIAL A BASE DE TENSOATIVO	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	62,55
copolímero Steareth-20 metacrilato /acrilatos	3,3
EDTA dissódico	0,05
Glicerina	2,0
Copolímero polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol (e) PVM/MA	0,5
Laureth sulfato de sódio (30%)	17,5
Álcool cetearílico	1,0
Manteiga de carité	1,0
Oleamido PEG-2 sulfossuccinato dissódico	5,0
Cocoamidopropil betaína	3,0
Sarcosinato de lauroil de sódio	1,0

LIMPADOR FACIAL A BASE DE TENSOATIVO	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Cocoato de gliceril PEG-7	1,0
Oleato de isodecila	1,5
Extrato de hortelã-pimenta	0,25
Extrato de eucalipto	0,25
Fragrância, conservante, cor, ajuste de pH	QS
Composto	SA

GEL ESFOLIANTE FACIAL	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	64,39
EDTA dissódico	0,05
Aloe vera (babosa)(200x)	0,01
Benzofenona-4	0,25
Propileno glicol	1,0
Polímero cruzado/ acrilatos C10-30 acrilato de alquila (2%)	20,0
Polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol	10,0
Copolímero polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol (e) PVM/MA	1,0
Óleo de jojoba hidrogenado	1,5
Fragrância, conservante, cor, ajuste de pH	QS
Composto	SA

TONALIZANTE FACIAL	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	93,99
EDTA dissódico	0,1

TONALIZANTE FACIAL	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Butileno glicol	2,0
Aloe vera (babosa) (200x)	0,1
Alantoína	0,1
Benzofenona-4	0,5
Extrato de hamamélia	0,3
Propileno glicol (e) extrato de eufrásia (e) extrato de raiz de Golden Seal (e) extrato de chá verde	0,01
PEG-40 óleo de rícino hidrogenado	0,5
Quaternio-22	0,5
Óleo de madeira de sândalo	0,02
Fragrância, conservante, cor, ajuste de pH	QS
Composto	SA

CREME ESFOLIANTE	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	68,80
EDTA dissódico	0,1
Polímero cruzado de PVM/MA decadieno	1,0
Butileno glicol	3,0
Estearato de PEG-20	1,0
Estearato de glicerila (e) laureth-23	2,0
Adipato de diisopropila	2,0
Oleato de isodecila	2,0
Estearato de isocetil estearoíla	5,0
Miristato de miristila	1,0
Dilaurato de glicerila	2,0
Hidróxido de sódio, 10%	2,6

CREME ESFOLIANTE	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol	5,0
Copolímero polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol (e) PVM/MA	0,5
Óleo de jojoba hidrogenado	3,0
Fragrância, conservante, cor, ajuste de pH	QS
Composto	SA

MÁSCARA FACIAL	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	76,4
EDTA dissódico	0,1
Bentonita	12,5
Fosfato de potássio C12-13 alquila	5,0
Propileno glicol	4,0
Fosfato de cloreto de coco PG-diamônio sódico	1,0
Fragrância, conservante, cor, ajuste de pH	QS
Composto	SA

BÁLSAMO PÓS-BARBA	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	82,12
EDTA dissódico	0,1
Copolímero de acrilato	2,0
Acrilato/copolímero de metacrilato de Stareth-20	1,0
Propileno glicol	3,0
Hidróxido de sódio (10%)	1,28

Estearato de glicerila (e) álcool cetílico (e) álcool esteárico (e) álcool beenílico (e) ácido palmítico (e) ácido esteárico (e) cloreto de hidroxietil cetearamidopropildiamônio	3,5
Estearato de isocetila	1,0
Lactato de C12-15 alquila	1,5
Estearato do octildodecila	3,0
Copolímero polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol (e) PVM/MA	1,0
Poliquaternio-11	0,5
Fragrância, conservante, cor, ajuste de pH	QS
Composto	SA

GEL PARA OS OLHOS	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	89,14
Copolímero VP/acrilatos/ metacrilato de laurila	0,5
Glicerina	5,0
Aminometil propanol	0,3
Aloe vera (babosa) (200x)	0,05
Benzofenona-4	0,1
Copolímero polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol (e) de PVM/MA	0,2
Butileno glicol (e) água (e) extrato de hamamélia	0,5
Butileno glicol (e) água (e) extrato de pepino	0,3
PEG-40 óleo de rícino hidrogenado	0,01
Copolímero acrilatos/ metacrilato de Beheneth-25	2,4
Fragrância, conservante, cor, ajuste de pH	QS
Composto	SA

BATOM DE PONTO DE FUSÃO ELEVADO	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Cera de ozocerita	5,0
Cera de candelila	11,0
Dodecanol octila	26,0
C30-45 alquil meticona	5,0
Ciclometicona	4,8
Petrolato	3,0
Óleo de lanolina	9,0
Óleo de abacate	2,0
Álcool oleílico	8,0
Pigmento/ciclometicona	25,0
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

BATOM	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Cera de candelila	9,1
Miristato de isopropila	9,6
Lanolina	5,0
Cera de abelha	4,0
Parafina (130/135)	2,0
Cera de ozocerita	2,5
Óleo de rícino	53,7
Cera de carnaúba	1,5
Pigmentos	7,5
Óleo mineral	4,0
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

BRILHO PARA OS LÁBIOS	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Poliaciladipato-1 de bis-diglicerila	43,5
Poliaciladipato-2 de bis-diglicerila	10
Ricinoleato de glicerol	10
Poliisobuteno 1000	13
Cera de lanolina	10
Cera de candelila	2,5
Mica (e) dióxido de titânio	3
d-Pantenol	5
Fragrância, conservante, cor	QS
Composto	SA

BRILHO PARA OS LÁBIOS COM FILTRO SOLAR	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Citrato de triisosteáril	58,4
Cera de candelila	8,0
Lactato de miristila	7,5
Cera microcristalina	5,0
Cera de carnaúba	2,0
Dímero dilinoleato de diisopropila	10,0
Mica (e) oxicleto de bismuto (e) carmine	6,0
Óxido de zinco (microfino)	2,0
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

BÁLSAMO PARA OS LÁBIOS	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Petrolato	47,3
Lanolato de isopropila	6,0
Cera de ozocerita	16,5
Cera de candelila	4,5
Dilinoleato de diisopropila	25,0
Palmitato de retinila	0,5
Acetato de tocoferol	0,2
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

RÍMEL À PROVA D'ÁGUA	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	49,45
Propileno glicol	3,0
Trietanolamina (99%)	3,1
Copolímero acrilatos/ octilacrilamina	5,0
Silicato de diisosteárol silóxi trimetilolpropano	5,0
Cera de candelila	4,5
Cera de abelha	5,5
Cera de ozocerita	2,0
Cera de carnaúba	1,0
Álcool cetílico	3,0
Ácido esteárico	5,0
Óxidos de ferro	11,0
Fragrância, conservante	QS

RÍMEL À PROVA D'ÁGUA	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Composto	SA

RÍMEL ANIDRO À PROVA D'ÁGUA	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
C9-11 isoparafina	30,95
Polietileno	11,0
Cera de candelila	4,5
Lanolina hidroxilada	0,25
Rosinato de pentaeritritila	2,0
Estearato de zinco	1,0
Silicato de sílica	1,0
Petróleo destilado (e) hectorita quaternii-18 (e) carbonato de propileno	35,0
Óxidos de ferro	12,0
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

RÍMEL À BASE D'ÁGUA	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	43,32
Polivinil pirrolidona (K30)	2,0
Hidroxietil celulose	1,0
Trietanolamina (99%)	2,0
EDTA dissódico	0,1

RÍMEL À BASE D'ÁGUA	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Óxidos de ferro	10,0
Ácido esteárico	4,5
Monoestearato de glicerila	2,0
Cera de abelha	7,0
Cera de carnaúba	4,5
Lanolina hidroxilada	1,0
Copolímero de acrilatos	20,0
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

DELINEADOR LÍQUIDO	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	50 – 70
Gelificante	0,5 – 1,5
Agente (s) umedecedor	1 – 3
Poliol	4 – 8
Corantes	10 – 20
Álcool	5 – 10
Formador de película	3 – 8
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

ESMALTE DE UNHAS	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Solvente (s)	40 – 70
Resina (s)	10 – 20
Plastificante	3 – 12
Gelificante	0 – 2
Corantes	0 – 3
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

TRATAMENTO DE CUTÍCULA	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Petrolato	<u>34,8</u>
Cera de abelha	<u>7,2</u>
Cera de ozocerita	<u>4,3</u>
Cera de candelila	<u>4,0</u>
Manteiga de cacau	<u>1,0</u>
Manteiga de carité	<u>1,0</u>
Dilaurato de glicerila	<u>8,0</u>
Palmitato de etilhexila	<u>20,0</u>
Lactato de C12-15 alquila	<u>6,0</u>
Copolímero de PVP/eicoseno	<u>3,5</u>
Adipato de diisopropila	<u>2,0</u>
Octinoxato	<u>7,5</u>
Palmitato de retinila	<u>0,1</u>
Acetato de tocoferol	<u>0,1</u>
Fragrância, conservante, cor, ajuste de pH	QS

TRATAMENTO DE CUTÍCULA	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Petrolato	<u>34,8</u>
Cera de abelha	<u>7,2</u>
Composto	SA

FORMULAÇÕES DE PÓ PRENSADO					
	Pó solto	Pó prensado	Base	Blush	Sombra de olho
Cargas (por exemplo, talco, mica, seracita)	70-95	40-90	40-80	40-80	40-80
Auxiliares de compressão (por exemplo, sabões metálicos, ceras)	0-2,5	3-5	2-5	2-7	2-10
Melhoradores de textura	10-40	5-40	10-40	10-40	0-30
Corantes (por exemplo, óxidos de ferro, cores orgânicas)	2-10	2-10	5-20	2-10	1-40
Pérolas (por exemplo, mica titana-da, oxicleto de bismuto)	0-20	0-10	0-5	0-20	0-60
Aglutinante úmido (por exemplo, estearato de octildodecil estearoíla, adipato de éter di-PPG3 miris-tílico, estearato de isocetila, dimeticona de cetila)	0-3	2-5	2-5	3-10	3-15

FORMULAÇÕES DE PÓ PRENSADO					
	Pó solto	Pó prensado	Base	Blush	Sombra de olho
Aglutinante seco (por exemplo, silicato de cálcio, caulim)	0-2	2-5	2-5	3-8	3-8
Fragrância, conservante	QS	QS	QS	QS	QS
Composto	SA	SA	SA	SA	SA

BASE ÁGUA-EM-ÓLEO	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Ciclometicona	12,0
Dimeticona	5,0
Ciclometicona (e) copoliol dimeticona	20,0
Laureth-7	0,5
Corantes (hidrofobicamente tratados)	2,2
Dióxido de titânio (e) meticona	8,5
Talco (e) meticona	3,3
Água	37,2
Cloreto de sódio	2,0
Propileno glicol	8,0
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

BASTÃO ANIDRO DE MAQUILAGEM	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Cera de ozocerita	5,6

BASTÃO ANIDRO DE MAQUILAGEM	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Polietileno	5,3
Dilaurato de glicerila	5,5
Neopentanoato de isoestearila	13,0
Estearato de octildodecil estearoíla	12,0
Miristato de miristila	11,0
Metoxicinamato de etilhexila	7,5
Copolímero de PVP/eicoseno	0,5
Acetato de tocoferol	0,1
Dimeticona (e) silicato de trimetilsilóxi	8,0
Ciclopentassiloxano	9,0
Mica	10,0
Talco	1,7
Dióxido de titânio (e) triisoestearato de isopropil titânio	8,86
Óxidos de ferro (e) triisoestearato de isopropil titânio	1,94
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

BASE ÁGUA-EM-SILICONE	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Copoliol de cetil dimeticona	0,45
Isoestearato de poliglicerol-4 (e) copoliol de cetil dimeticona (e) laurato de hexila	1,75
Copolímero de polialquileno polissiloxano	0,9
Cetil dimeticona	0,9
Cera de abelha	0,7
Cera de rícino (e) óleo de rícino hidrogenado	0,35

BASE ÁGUA-EM-SILICONE	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Palmitato de octila	7,0
Ciclometicona	7,95
Fenil trimeticona	2,2
Dióxido de titânio (e) caprilil silano	7,5
Óxidos de ferro (e) caprilil silano	1,1
Talco (e) caprilil silano	3,8
Ciclometicona	7,95
Dimeticona	1,3
Água	49,55
Cloreto de sódio	0,5
Propileno glicol	5,3
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

BASE ÓLEO-EM-ÁGUA	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água	59,85
Polivinilpirrolidona	5,0
Aluminossilicato de magnésio	2,0
Goma de xantano	0,4
EDTA trissódico	0,05
Copolímero polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol (e) PVM/MA	1,0
Polissorbato 20	1,0
Caulim	0,8
Butileno glicol	4,0

Dióxido de titânio	6,05
Óxidos de ferro	1,15
Dimeticona	6,0
Palmitato de etilhexila	2,0
PEG/PPG-25/25 dimeticona	1,0
Acetato de tocoferol	0,1
Palmitato de retinila	0,1
Sílica	3,0
Ciclopentassiloxano	5,0
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

FÓRMULA DE FILTRO SOLAR		
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade	
	SPF ~25	SPF~15
Água	52,65	71,10
Polímero cruzado de PVM/MA decadieno	0,5	0,5
Butileno glicol	3,0	3,0
EDTA dissódico	0,1	0,1
Estearato de PEG-20	1,5	1,5
Estearato de glicerila (e) laureth-23	2,0	2,0
Neopentanoato de isoestearila	1,0	1,0
Palmitato de etilhexila	2,0	2,0
Dilaurato de glicerila	0,5	0,5
Octinoxato	7,5	7,5
Oxibenzona	2,0	2,0
Salicilato de etilhexila	3,0	3,0
Hidróxido de sódio (10%)	1,3	1,3
Polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol	3,0	3,0

FÓRMULA DE FILTRO SOLAR		
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade	
Copolímero polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol (e) PVM/MA	0,5	0,5
Copolímero estireno/ acrilatos (27% sólidos)	18,45	-
Fragrância, conservante	QS	QS
Composto	SA	SA

FÓRMULA DE FILTRO SOLAR MUITO RESISTENTE A ÁGUA	Quantidade	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)		
	SPF ~12	SPF~22
Água	65,16	46,53
Copolímero acrilatos	3,0	3,0
EDTA dissódico	0,1	0,1
Butileno glicol	2,0	2,0
Copolímero Polimetacrilato de glicerila (e) propileno glicol (e) PVM/MA	1,0	1,0
PVP butilado	0,05	0,05
Estearato de glicerila (e) álcool beenílico (e) ácido palmítico (e) ácido esteárico (e) lecitina (e) álcool laurílico	4,5	4,5
PVP tricontanila	1,0	1,0
Palmitato de octila	2,0	2,0
Octinoxato	7,5	7,5
Oxibenzona	2,0	2,0
Salicilato de etilhexila	3,0	3,0
Neopentanoato de tridecila	3,0	3,0
Dilaurato de glicerila	0,5	0,5
Hidróxido de sódio (10%)	1,89	1,89

FÓRMULA DE FILTRO SOLAR MUITO RESISTENTE A ÁGUA	Quantidade	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)		
Ciclopentassiloxano	2,0	2,0
Butileno glicol	1,0	1,0
Estireno/copolímero de acrilatos (27% sólidos)	18,45	-
Fragrância, conservante	QS	QS
Composto	SA	SA

FILTRO SOLAR ÁGUA-EM-SILICONE	Quantidade
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	
Éter cetil PEG/PPG-15/15 butílico dimeticona	2,0
Óleo mineral	3,0
Palmitato de etilhexila	1,0
Salicilato de etilhexila	5,0
Óleo de rícino hidrogenado	0,5
Cera de abelha	0,5
Octinoxato	7,5
Polietileno	1,0
Dipolihiidroxiestearato PEG-30	2,0
Ciclopentassiloxano	5,0
Dimeticona	5,0
Cloreto de sódio	0,6
Copolímero Acrilatos/ metacrilato de C12-22 de alquila	0,5
Água	66,4
Fragrância, conservante	QS
Composto	SA

CONDICIONADOR SEM ENXÁGUE DO CABELO

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água deionizada	QS
Lactato de isoestearamidopropil morfolina	6,0
Hidroxietilcelulose	1,0
Conservante, fragrância, cor	QS
Composto	1000 ppm

CREME RINSE (pH 4)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água deionizada	QS
Cloreto de behentrimônio	2,0
Fosfato de trilaureth-4	1,5
Álcool cetílico	2,0
Ácido cítrico	QS
Conservante, fragrância, cor	QS
Composto	1000 ppm

CONDICIONADOR /TRATAMENTO NUTRIENTE DE CABELO (pH 6)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água deionizada	QS
Metossulfato de behentrimônio (e) álcool cetílico	4,0
Óleo de gérmen de trigo	1,0
Álcool cetílico	0,5
Propileno glicol	5,0
PEG-60 lanolina	1,0
Pantenol	2,0
Aminoácidos de lupina	1,0

CONDICIONADOR /TRATAMENTO NUTRIENTE DE CABELO (pH 6)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Proteína de trigo cocodimônio hidroxipropil hidrolisado	1,0
Fragrância, conservante, cor	QS
Composto	1000 ppm

XAMPU CONDICIONADOR

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água deionizada	QS
Laureth sulfato de sódio a 30%	27,0
Betaína de cocamidopropila	3,7
Coco-glucosídeo (e) oleato de glicerila	5,0
Coco-glucosídeo (e) distearato de glicol (e) glicerina	3,0
Cloreto de hidroxipropiltrimônio guar	0,1
Laureth-2	1,55
Fragrância, conservante, cor	QS
Composto	1000 ppm

XAMPU ANTICASPA

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	Quantidade
Água deionizada	QS
Aluminossilicato de magnésio	1,0
Hidroxipropil metilcelulose	0,8
Sulfato de olefina de sódio a 40%	35,0
Lauramida DEA	4,0
Soyamida DEA	1,0
Colágeno de Quaternio-70 hidrolisado	2,0
40% de piritona de zinco	4,0
Fragrância, conservante, cor	QS
Composto	1000 ppm

XAMPU TRANSPARENTE**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Texapon N 70	13,00	15,00	10,50	12,50	10,00
Dehyton PK 45	7,50	7,00	5,00	5,50	10,00
Cetiol HE	2,00	2,50	3,50	5,00	2,30
Fragrância	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Composto	SA	SA	SA	SA	SA
D-Pantenol USP	1,00	1,50	1,80	1,70	1,40
Conservante	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Ácido cítrico	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Luviquat Ultra Care	1,50	1,00	1,50	1,20	1,10
Cloreto de sódio	1,50	1,40	1,40	1,30	1,50
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

XAMPU**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Texapon NSO	35,00	40,00	30,00	45,00	27,00
Plantacare 2000	5,00	5,50	4,90	3,50	7,00
Tego Betaína L7	10,00	5,00	12,50	7,50	15,00
Fragrância	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Composto	SA	SA	SA	SA	SA
D-Pantenol USP	0,50	1,00	0,80	1,50	0,50
Conservante	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Ácido cítrico	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Rewopal LA 3	0,50	2,00	0,50	0,50	2,00
Cloreto de sódio	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

**XAMPU CONDICIONADO
TRANSPARENTE**

**Formulações
(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Amphotensid GB 2009	10,00	15,00	20,00	12,00	17,00
Plantacare 2000	5,00	6,00	7,00	8,00	4,00
Tego Betaína L7	15,00	12,00	10,00	18,00	20,00
Luviquat FC 550	0,30	0,20	0,20	0,20	0,30
Fragrância	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Composto	SA	SA	SA	SA	SA
Cremophor PS 20	5,00	1,00	1,00	7,00	5,00
Conservante	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Rewopal LA 3	2,00	1,00	0,50	2,00	2,00
Ácido cítrico	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Stepan PEG 600 DS	3,00	2,00	2,00	3,00	2,50
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

EMULSÃO O/A- ESPUMA	Formulações (Quantidades)	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2
Ácido esteárico	5,00	1,00
Álcool cetílico	5,50	
Álcool cetilestearílico		2,00
Estearato de PEG-40	8,50	
Estearato de PEG-20		1,00
Triglicerídeo de ácido caprílico/cáprico	4,00	2,00

EMULSÃO O/A- ESPUMA	Formulações	
	(Quantidades)	
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2
Alquilbenzoato de C12-15	10,00	15,00
Ciclometicona	4,00	
Dimeticona		0,50
Composto	SA	SA
Octilisostearato		5,00
Miristato de miristila		2,00
Ceresina	1,50	
Glicerina		3,00
Filtro		
Fosfato de hidroxipropil guar	1,00	3,50
BHT		0,02
EDTA dissódico	0,50	0,10
Perfume, conservante	QS	QS
Colorante	QS	QS
Hidróxido de potássio	QS	QS
Água dem.	QS (100)	QS (100)
	pH ajustado a 6,5-7,5	pH ajustado a 5,0-6,0
Emulsão 1		
Emulsão 2		
Gás (Nitrogênio)		
Gás (hélio)		

**XAMPU CONDICIONADOR
COM PEROLESCENTE**

Formulações
(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3
Poliquarternio-10	0,50	0,50	0,40
Laureth sulfato de sódio	9,00	8,50	8,90
Cocoamidopropilbetaína	2,50	2,60	3,00
Benzofenona-4	1,50	0,50	1,00
Composto	SA	SA	SA
Composto perolescente	2,00	2,50	
EDTA dissódico	0,10	0,15	0,05
Conservante, perfume, espessante	QS	QS	QS
Água dem.	QS (100)	QS (100)	QS (100)

pH ajustado a 6,0

**XAMPU CONDICIONADOR
TRANSPARENTE**

Formulações
(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3
Poliquarternio-10	0,50	0,50	0,50
Laureth sulfato de sódio	9,00	8,50	9,50
Composto	SA	SA	SA
Benzofenona-3	1,00	1,50	0,50
Ácido imido succínico, Na	0,20	0,20	0,80
Conservante, Perfume, espessante	QS	QS	QS
Água dem.	QS (100)	QS (100)	QS (100)

Ph ajustado a 6,0

XAMPU CONDICIONADOR TRANSPARENTE**Formulações****COM EFEITO AVOLUMADOR****(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3
Laureth sulfato de sódio	10,00	10,50	11,00
Metoxicinamato de etilhexila	2,00	1,50	2,30
Composto	SA	SA	SA
Cocoamidopropilbetaína	2,50	2,60	2,20
EDTA dissódico	0,01	0,10	0,01
Conservante, Perfume, espessante	QS	QS	QS
Água dem.	QS (100)	QS (100)	QS (100)

pH ajustado a 6,0

XAMPU CONDICIONADOR COM**Formulações****PEROLESCENTE****(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3
Poliquarternio-10	0,50	0,50	0,40
Laureth sulfato de sódio	9,00	8,50	8,90
Cocoamidopropilbetaína	2,50	2,60	3,00
Benzofenona-4	1,50	0,50	1,00
Composto	SA	SA	SA
Composto perolescente	2,00	2,50	
EDTA dissódico	0,10	0,15	0,05
Conservante, Perfume, espessante	QS	QS	QS
Água dem.	QS (100)	QS (100)	QS (100)

pH ajustado a 6,0

XAMPU CONDICIONADOR**TRANSPARENTE****Formulações****(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3
Poliquarternio-10	0,50	0,50	0,50
Laureth sulfato de sódio	9,00	8,50	9,50
Composto	SA	SA	SA
Benzofenona-3	1,00	1,50	0,50
Ácido imidossuccínico, Na	0,20	0,20	0,80
Conservante, Perfume, espessante	QS	QS	QS
Água dem.	QS (100)	QS (100)	QS (100)

pH ajustado a 6,0

XAMPU CONDICIONADOR TRANSPARENTE**COM EFEITO DE AVOLUMADOR****Formulações****(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3
Laureth sulfato de sódio	10,00	10,50	11,00
Metoxicinamato de etilhexila	2,00	1,50	2,30
Composto	SA	SA	SA
Cocoamidopropilbetaína	2,50	2,60	2,20
EDTA dissódico	0,01	0,10	0,01
Conservante, Perfume, espessante	QS	QS	QS
Água dem.	QS (100)	QS (100)	QS (100)

pH ajustado a 6,0

CREME EM GEL**Formulações****(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Acrilato/polímero cruzado de C10-30 acrilato de alquila	0,40	0,35	0,40	0,35
Ácido poliacrílico	0,20	0,22	0,20	0,22
Goma de xantano	0,10	0,13	0,10	0,13
Álcool cetearílico	3,00	2,50	3,00	2,50
Alquilbenzoato de C12-15	4,00	4,50	4,00	4,50
Triglicerídeo caprílico/cáprico	3,00	3,50	3,00	3,50
Aminobenzofenona (por exemplo, UVI- NUL A PLUS™)	2,00	1,50	0,75	1,00
UVASorb K2A		3,00		
Metoxicinamato de etilhexila	3,00		1,00	
Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina		1,50		2,00
Metoxidibenzoilmetano butila			2,00	
Tetrassulfonato de fenil dibenzimidazol dissódico	2,50		0,50	2,00
Etilhexil Triazona	4,00		3,00	4,00
Octocrileno		4,00		
Dietilhexil butamido triazona	1,00			2,00
Ácido sulfo -fenilbenzimidazol	0,50		3,00	
Bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol de metileno	2,00		0,50	1,50
Salicilato de etilhexila			3,00	
Drometrizol trissiloxano			0,50	
Ácido sulfônico tereftalideno dicânfora		1,50		1,00
Dietilhexil-2,6-naftalato	3,50	4,00	7,00	9,00
Dióxido de titânio-microfino	1,00		3,00	
Óxido de zinco-microfino				0,25

CREME EM GEL**Formulações****(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Composto	SA	SA	SA	SA
Dimetilpolissiloxano cíclico	5,00	5,50	5,00	5,50
Polidimetilsiloxano dimeticona	1,00	0,60	1,00	0,60
Glicerina	1,00	1,20	1,00	1,20
Hidróxido de sódio	QS.	QS	QS	QS
Conservante	0,30	0,23	0,30	0,23
Perfume	0,20		0,20	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)
pH ajustado a 6,0				

CREME EM GEL	Formulações (Quantidades)			
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Polímero cruzado acrilato/ C10-30 acrilato de alquila	0,40	0,35	0,40	0,35
Ácido poliacrílico	0,20	0,22	0,20	0,22
Goma de xantano	0,10	0,13	0,10	0,13
Álcool cetearílico	3,00	2,50	3,00	2,50
Alquilbenzoato de C12-15	4,00	4,50	4,00	4,50
Triglicerídeo caprílico/cáprico	3,00	3,50	3,00	3,50
Aminobenzofenona (por exemplo, UVI-NUL A PLUS™)	2,00	1,50	0,75	1,00
UVASorb K2A		3,00		
Metoxicinamato de etilhexila	3,00		1,00	

CREME EM GEL	Formulações			
	(Quantidades)			
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina		1,50		2,00
Metoxidibenzoilmetano de butila			2,00	
Tetrassulfonato de fenil dibenzimidazol dissódico	2,50		0,50	2,00
Etilhexil Triazona	4,00		3,00	4,00
Octocrileno		4,00		
Dietilhexil butamido triazona	1,00			2,00
Ácido sulfônico de fenilbenzimidazol	0,50		3,00	
Tetrametilbutilfenol bis-benzotriazolil de metileno	2,00		0,50	1,50
Salicilato de etilhexila			3,00	
Drometrisol trissiloxano			0,50	
Ácido sulfônico de tereftalideno dicânfora		1,50		1,00
Dietilhexil-2,6-naftalato	3,50	4,00	7,00	9,00
Dióxido de titânio-microfino	1,00		3,00	
Óxido de zinco-microfino				0,25
Composto	SA	SA	SA	SA
Dimetilpolissiloxano cíclico	5,00	5,50	5,00	5,50
Polidimetilsiloxano Dimeticona	1,00	0,60	1,00	0,60
Glicerina	1,00	1,20	1,00	1,20
Hidróxido de sódio	QS	QS	QS	QS
Conservante	0,30	0,23	0,30	0,23
Perfume	0,20		0,20	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)
pH ajustado a 6,0				

FORMULAÇÃO O/A DE
FILTRO SOLAR

Formulação
(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCIs)	1	2	3	4	5	6	7
Monoestearato de glicerina SE	0,50	1,00	3,00			1,50	
Citrato estearato de glicerila	2,00		1,00	2,00	4,00		
Ácido esteárico		3,00		2,00			
Estearato de PEG-40	0,50					2,00	
Fosfato de cetila						1,00	
Sulfato de cetearila							0,75
Álcool estearílico			3,00			2,00	0,60
Álcool cetílico	2,50	1,10		1,50	0,60		2,00
Composto	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Aminobenzofenona (por exemplo, UVINUL A PLUS™)	2,00	1,50	0,75	1,00	2,10	4,50	5,00
UVASorb K2A							
Metoxicinamato de etilhexila					5,00	6,00	8,00
Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina		1,50		2,00	2,50		2,50
Metoxidibenzoilmetano de butila			2,00		2,00	1,50	
Tetrassulfonato de fenil dibenzimidazol dissódico	2,50		0,50	2,00		0,30	
Etilhexil triazona	4,00		3,00	4,00		2,00	
Octocrileno		4,00					7,50
Dietilhexil butamido triazona	1,00			2,00	1,00		1,00
Ácido sulfônico de fenilbenzimidazol	0,50		3,00				
Tetrametilbutilfenol bis-benzotriazolil de metileno	2,00		0,50	1,50	2,50		
Salicilato de etilhexila			3,00				5,00
Drometrizol trissiloxano			0,50			1,00	

FORMULAÇÃO O/A DE
FILTRO SOLAR
Formulação
(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCIs)	1	2	3	4	5	6	7
Ácido tereftalideno dicânfora sulfônico		1,50		1,00	1,00		0,50
Dietilhexil-2,6-naftalato	3,50		7,00		6,00	9,00	
Dióxido de titânio-microfino	1,00		3,00		3,50		1,50
Óxido de zinco-microfino				0,25		2,00	
Benzoato de alquila C12-15		0,25			4,00	7,00	
Éter dicaprílico			3,50		2,00		
Butilenoglicol dicaprílico/dicáprico	5,00		6,00				
Glicerídeo de coco			6,00		2,00		
Dimeticona	0,50		1,00		2,00		
Ciclometicona	2,00		0,50		0,50		
Manteiga de carité		2,00					
Copolímero hexadeceno PVP	0,20			0,50		1,00	
Glicerina	3,00	7,50		7,50	5,00		2,50
Goma de xantano	0,15		0,05			0,30	
Carbômero de sódio		0,20		0,15	0,25		
Acetato de vitamina E	0,60		0,23		0,70	1,00	
Fucogel 1000		3,00	10,00				
Glicina de soja				0,50		1,50	1,00
Etilhexiloxiglicina	0,30						
Hidantoína DMDM		0,60	0,40	0,20			
Gliacil-L				0,18	0,20		
Metilparabeno	0,15		0,25		0,50		
Fenoxietanol	1,00	0,40			0,40	0,50	0,40
EDTA trissódico	0,02		0,05				
Ácido iminossuccínico				0,25	1,00		

FORMULAÇÃO O/A DE
FILTRO SOLAR
Formulação

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6	7
Etanol	2,00	1,50		3,00		1,20	5,00
Perfume	0,10	0,25	0,30		0,40	0,20	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

HIDRODISPERSÃO
Formulações

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Ceteaereth-20	1,00			0,50	
Álcool cetílico			1,00		
Carbômero de sódio		0,20		0,30	
polímero cruzado acrilato/ C10-30 acrilato de alquila	0,50		0,40	0,10	0,50
Goma de xantano		0,30	0,15		
Composto	SA	SA	SA	SA	SA
Aminobenzofenona (por e- xemplo, UVINUL A PLUS™)	2,00	1,50	0,75	1,00	2,10
UVASorb K2A		3,50			
Metoxicinamato de etilhexila					5,00
Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina		1,50		2,00	2,50
Metoxidibenzoilmetano de bu- tila			2,00		2,00
Tetrassulfonato de fenil diben- zimidazol dissódico	2,50		0,50	2,00	
Etilhexila triazona	4,00		3,00	4,00	

HIDRODISPERSÃO**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Octocrileno		4,00			
Dietilhexil butamido triazona	1,00			2,00	1,00
Ácido sulfônico de fenilbenzi- midazol	0,50		3,00		
Tetrametilbutilfenol de bis- benzotriazolil de metileno	2,00		0,50	1,50	2,50
Salicilato de etilhexila			3,00		
Drometrizol trissiloxano			0,50		
Ácido sulfônico de tereftalide- no de dicânfora		1,50		1,00	1,00
Dietilhexil-2,6-naftalato			7,00		9,00
Dióxido de titânio-microfino	1,00		3,00		3,50
Óxido de zinco-microfino				0,25	
Benzoato de C12-15 alquila	2,00	2,50			
Éter dicaprílico		4,00			
Butilenoglicol dicaprílico/dicá- prico	4,00		2,00	6,00	
Carbonato dicaprílico		2,00	6,00		
Dimeticona		0,50	1,00		
Feniltrimeticona	2,00		0,50		
Manteiga de carité		2,00		5,00	
Copolímero hexadeceno PVP	0,50			0,50	1,00
Tricontanila PVP	0,50		1,00		
Glicerina de etilhexila			1,00		0,80
Glicerina	3,00	7,50		7,50	8,50
Glicina de soja			1,50		1,00
Acetato de vitamina E	0,50		0,25		1,00

HIDRODISPERSÃO**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Alfa-glucosilrutina	0,60			0,25	
Fucogel 1000		2,50	0,50		2,00
Hidantoína DMDM		0,60	0,45	0,25	
Gliacil-S	0,20				
Metilparabeno	0,50		0,25	0,15	
Fenoxietanol	0,50	0,40		1,00	
EDTA trissódico		0,01	0,05		0,10
Etanol	3,00	2,00	1,50		7,00
Perfume	0,20		0,05	0,40	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

EMULSÃO A/O DE FILTRO SOLAR**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Copoliol cetildimeticona		2,50		4,00	
Poligliceril-2-dipolihiidroxiestearato	5,00				4,50
PEG-30-dipolihiidroxiestearato			5,00		
Composto	SA	SA	SA	SA	SA
Aminobenzofenona (por exemplo, UVINUL A PLUS™)	2,00	1,50	0,75	1,00	2,10
UVASorb K2A		2,00			
Metoxicinamato de etilhexila					5,00
Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina		1,50		2,00	2,50
Metoxidibenzoilmetano de butila			2,00		2,00

EMULSÃO A/O DE FILTRO SOLAR**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Tetrassulfonato de fenil dibenzimidazol dissódico	2,50		0,50	2,00	
Etilhexil triazona	4,00		3,00	4,00	
Octocrilen		4,00			
Dietilhexil butamido triazona	1,00			2,00	1,00
Ácido sulfônico fenilbenzimidazol	0,50		3,00		
Bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol de metileno	2,00		0,50	1,50	2,50
Salicilato de etilhexila			3,00		
Drometrizol trissiloxano			0,50		
Ácido sulfônico de tereftalideno dicânfora		1,50		1,00	1,00
Dietilhexil-2,6-naftalato			7,00		4,00
Dióxido de titânio-microfino	1,00		3,00		3,50
Óxido de zinco-microfino				0,25	
Óleo mineral		12,00	10,00		8,00
Benzoato de alquila C12-15				9,00	
Éter dicaprílico	10,00				7,00
Butilenoglicol dicaprílico/dicáprico			2,00	8,00	4,00
Carbonato de dicaprílico	5,00		6,00		
Dimeticona		4,00	1,00	5,00	
Ciclometicona	2,00	2,50			2,00
Manteiga de carité			3,00		
Vaselina		4,50			
Copolímero de hexadeceno PVP	0,50			0,50	1,00
Glicerina de etilhexila		0,30	1,00		0,50
Glicerina	3,00	7,50		7,50	8,50

EMULSÃO A/O DE FILTRO SOLAR**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Glicina de soja		1,00	1,50		1,00
MgSO ₄	1,00	0,50		0,50	
MgCl ₂			1,00		0,70
Acetato de vitamina E	0,50		0,25		1,00
Palmitato de ascorbila	0,50			2,00	
Fucogel 1000				3,50	1,00
Hidantoína DMDM		0,60	0,40	0,20	
Metilparabeno	0,50		0,25	0,15	
Fenoxietanol	0,50	0,40		1,00	
EDTA trissódico	0,12	0,05		0,30	
Etanol	3,00		1,50		5,00
Perfume	0,20		0,40	0,35	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

BASTÕES**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Triglicerídeo caprílico/cáprico	12,00	10,00	6,00	
Octildodecanol	7,00	14,00	8,00	3,00
Butileno glicol dicaprílico/dicáprico				12,00
Tetraisoestearato de pentaeritritila	10,00	6,00	8,00	7,00
Diisoestearato de poligliceril-3	2,50			
Poliaciladipato-2 de bis-diglicerila	9,00	8,00	10,00	8,00
Álcool cetearílico	8,00	11,00	9,00	7,00
Miristato de miristila	3,50	3,00	4,00	3,00

BASTÕES**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Cera de abelha	5,00	5,00	6,00	6,00
Cera de Carnaúba	1,50	2,00	2,00	1,50
Cera de alba	0,50	0,50	0,50	0,40
Estearato de alquila C16-40		1,50	1,50	1,50
Composto	SA	SA	SA	SA
Aminobenzofenona (por exemplo, UVINUL A PLUS™)	2,00	1,50	0,75	9,00
UVASorb K2A		2,00		4,00
Metoxicinamato de etilhexila		3,00		
Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazina		1,50		2,00
Metoxidibenzoilmetano de butila			2,00	
Tetrassulfonato de fenil dibenzimidazol dissódico	2,50		0,50	2,00
Etilhexil triazona	4,00		3,00	4,00
Octocrileno		4,00		
Dietilhexil butamido triazona	1,00			2,00
Ácido sulfônico fenilbenzimidazol	0,50		3,00	
Bis-benzotriazolil tetrametilbutilfenol de metileno	2,00		0,50	1,50
Salicilato de etilhexila			3,00	
Drometrizol trissiloxano			0,50	
Ácido sulfônico de tereftalideno dicânfora		1,50		1,00
Dietilhexil-2,6-naftalato			7,00	
Dióxido de titânio-microfino	1,00		3,00	
Óxido de zinco-microfino				0,25

BASTÕES**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Acetato de vitamina E	0,50	1,00		
Palmitato de ascorbila	0,05		0,05	
<i>Buxux Chinensis</i>	2,00	1,00		1,00
Perfume, BHT	0,10	0,25		0,35
<i>Ricinus Communis</i>	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

EMULSÃO PIT**Formulações (Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6	7	8
Monoestearato de glicerina SE	0,50	2,00	3,00	5,00		0,50	4,00	
Isoestearato de glicerila					3,50	4,00	2,00	
Isoceteth-20		0,50			2,00			
Ceteareth-12		5,00		1,00			3,50	5,00
Ceteareth-20		5,00		1,00				3,50
Estearato de PEG-100				2,80		2,30	3,30	
Álcool cetílico	5,20		1,20	1,00	1,30		0,50	0,30
Palmitato de cetila	2,50	1,20		1,50		0,50		1,50
Copoliol de cetil dimeticona				0,50		1,00		
Poligliceril-2				0,75	0,30			
Composto	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Aminobenzofenona (por e- xemplo, UVINUL A PLUS™)	2,00	1,50	0,75	1,00	2,10	4,50	5,00	2,10
UVASorb K2A			4,00				1,50	
Metoxicinamato de etilhexila					5,00	6,00	8,00	5,00
Bis-etilhexiloxifenol metoxife- nil triazina		1,50		2,00	2,50		2,50	2,50

EMULSÃO PIT**Formulações (Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6	7	8
Metoxidibenzoilmetano de butila			2,00		2,00	1,50		2,00
Tetrassulfonato de fenil di-benzimidazol dissódico	2,50		0,50	2,00		0,30		
Etilhexil triazona	4,00		3,00	4,00		2,00		
Octocrileno		4,00					7,50	
Dietilhexil butamido triazona	1,00			2,00	1,00		1,00	1,00
Ácido sulfônico de fenilben-zimidazol	0,50		3,00					
Bis-benzotriazolil tetrametil-butilfenol de metileno	2,00		0,50	1,50	2,50			2,50
Salicilato de etilhexila			3,00				5,00	
Drometrizol trissiloxano			0,50			1,00		
Ácido sulfônico de tereftalide-no dicânfora		1,50		1,00	1,00		0,50	1,00
Dietilhexil-2,6-naftalato			7,00		10,0 0	7,50		8,00
Dióxido de titânio-microfino	1,00		3,00		3,50		1,50	3,50
Óxido de zinco-microfino				0,25		2,00		
Benzoato de alquila C12-15	3,50			6,35				0,10
Cocoglicerídeo		3,00		3,00				1,00
Éter dicaprílico	4,50							
Carbonato de dicaprílico		4,30		3,00				7,00
Adipato de dibutila				0,50				0,30
Feniltrimeticona	2,00			3,50		2,00		
Ciclometicona		3,00						
Etil galactomanano		0,50			2,00			
Hidrato de coco-glicerídeo					3,00	4,00		

EMULSÃO PIT**Formulações (Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6	7	8
Abil Wax 2440						1,50	2,00	
Copolímero hexadeceno PVP				1,00	1,20			
Glicerina	4,00	6,00	5,00		8,00	10,00		
Acetato de vitamina E	0,20	0,30	0,40		0,30			
Manteiga de carité		2,00		3,60		2,00		
Carbamato de iodopropil butila	0,12				0,20			
Fucogel 1000				0,10				
Hidantoína DMDM	0,10				0,12		0,13	
Metilparabeno		0,50	0,30		0,35			
Fenoxietanol	0,50	0,40		1,00				
Octoxiglicerina		0,30			1,00		0,35	
Etanol	2,00		2,00			5,00		
EDTA trissódico	0,40		0,15			0,20		
Perfume	0,20		0,20		0,24	0,16	0,10	0,10
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

CREME EM GEL**Formulações****(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Acrilato/polímero cruzado de C10-30 acrilato de alquila	0,40	0,35	0,40	0,35
Ácido poliacrílico	0,20	0,22	0,20	0,22
Luvigel EM	1,50	2,50	2,80	3,50
Goma de xantano	0,10	0,13	0,10	0,13

CREME EM GEL**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Álcool cetearílico	3,00	2,50	3,00	2,50
Alquilbenzoato de C12-15	4,00	4,50	4,00	4,50
Triglicerídeo caprílico/cáprico	3,00	3,50	3,00	3,50
Dióxido de titânio-microfino	1,00		1,50	
Óxido de zinco-microfino		2,00		0,25
Composto	SA	SA	SA	SA
Dihidroxiacetona			3,00	5,00
Dimetilpolissiloxano cíclico	5,00	5,50	5,00	5,50
Dimeticona polidimetilsiloxano	1,00	0,60	1,00	0,60
Glicerina	1,00	1,20	1,00	1,20
Hidróxido de sódio	QS	QS	QS	QS
Conservantes	0,30	0,23	0,30	0,23
Perfume	0,20		0,20	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)
pH ajustado a 6,0				

FORMULAÇÕES DE AUTO-**Formulações****BRONZEAMENTO O/A**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6	7
Monoestearato de glicerina SE	0,50	1,00	3,00			1,50	
Citrato de estearato de glicerila	2,00		1,00	2,00	4,00		
Ácido esteárico		3,00		2,00			
Estearato de PEG-40	0,50					2,00	
Fosfato de cetila						1,00	
Sulfato de cetearila							0,75

**FORMULAÇÕES DE AUTO-
BRONZEAMENTO O/A**
**Formulações
(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6	7
Álcool estearílico			3,00			2,00	0,60
Álcool cetílico	2,50	1,10		1,50	0,60		2,00
Composto	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Dihidróxi acetona			3,00	5,00		4	
Dióxido de titânio- microfino	1,00				1,50		1,50
Óxido de zinco- microfino				0,25		2,00	
Benzoato de alquila C12-15		0,25			4,00	7,00	
Éter dicaprílico			3,50		2,00		
Butilenoglicol dicaprílico/dicáprico	5,00		6,00				
Cocoglicerídeo			6,00		2,00		
Dimeticona	0,50		1,00		2,00		
Ciclometicona	2,00		0,50		0,50		
Manteiga de carité		2,00					
Copolímero de hexadeceno PVP	0,20			0,50		1,00	
Glicerina	3,00	7,50		7,50	5,00		2,50
Goma de xantano	0,15		0,05			0,30	
Carbômero de sódio		0,20		0,15	0,25		
Acetato de vitamina A	0,60		0,23		0,70	1,00	
Fucogel 1000		3,00	10,00				
Glicina de soja				0,50		1,50	1,00
Etilhexilóxi glicina	0,30						
Hidantoína DMDM		0,60	0,40	0,20			
Gliacil-L				0,18	0,20		
Metilparabeno	0,15		0,25		0,50		

**FORMULAÇÕES DE AUTO-
BRONZEAMENTO O/A**
**Formulações
(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6	7
Fenoxietanol	1,00	0,40			0,40	0,50	0,40
EDTA trissódico	0,02		0,05				
Imino- ácido de Bernstein				0,25	1,00		
Etanol	2,00	1,50		3,00		1,20	5,00
Perfume	0,10	0,25	0,30		0,40	0,20	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

MAQUIAGEM O/A
Formulações (Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6	7
Monoestearato de glicerina SE	0,50	1,00	3,00			1,50	
Citrato de estearato de glicerila	2,00		1,00	2,00	4,00		
Ácido esteárico		3,00		2,00			
Estearato de PEG-40	0,50					2,00	
Fosfato de cetila						1,00	
Sulfato de cetearila							0,75
Álcool estearílico			3,00			2,00	0,60
Álcool cetílico	2,50	1,10		1,50	0,60		2,00
Composto	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Óxido de titânio	10,00	12,00	9,00	8,50	11,00	9,50	10,00
Óxido de ferro	2,00	4,00	3,00	5,00	3,40	6,00	4,40
Óxido de zinco		4,00		2,00		3,00	
Benzoato de alquila C12-15		0,25			4,00	7,00	
Éter dicaprílico			3,50		2,00		
Butilenoglicol dicaprílico/dicáprico	5,00		6,00				

MAQUIAGEM O/A

Formulações (Quantidades)

[illegible]

**HIDRODISPERSÃO AUTO-
BRONZEADORA**
**Formulações
(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Ceteaereth-20	1,00			0,50	
Álcool cetílico			1,00		
Luvigel EM		2,00		2,50	2,00
Polímero cruzado acrilato/ C10-30 acrilato de alquila	0,50		0,40	0,10	0,50
Goma de xantano		0,30	0,15		
Composto	SA	SA	SA	SA	SA
Dihidroxiacetona			3,00	5,00	
Aminobenzofenona (por e- xemplo, UVINUL A PLUS™)	2,00	1,50	0,75	1,00	2,10
Dióxido de titânio-microfino	1,00		1,00		1,00
Óxido de zinco-microfino		1,90		0,25	
Benzoato de alquila C12-15	2,00	2,50			
Éter dicaprílico		4,00			
Butilenoglicol dicaprili- co/dicáprico	4,00		2,00	6,00	
Carbonato de dicaprílico		2,00	6,00		
Dimeticona		0,50	1,00		
Feniltrimeticona	2,00		0,50		
Manteiga de carité		2,00		5,00	
Copolímero de hexadeceno PVP	0,50			0,50	1,00
PVP tricontanila	0,50		1,00		
Glicerina de etilhexila			1,00		0,80
Glicerina	3,00	7,50		7,50	8,50
Glicina de soja			1,50		1,00

**HIDRODISPERSÃO AUTO-
BRONZEADORA**
Formulações
(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Acetato de vitamina E	0,50		0,25		1,00
Alfa-glucosilrutina	0,60			0,25	
Hidantoína DMDM		0,60	0,45	0,25	
Gliacil-S	0,20				
Metilparabeno	0,50		0,25	0,15	
Fenoxietanol	0,50	0,40		1,00	
EDTA trissódico		0,01	0,05		0,10
Etanol	3,00	2,00	1,50		7,00
Perfume	0,20		0,05	0,40	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

HIDRODISPERSÃO PÓS-SOL
Formulações
(Quantidades)

	1	2	3	4	5
Ceteaereth-20	1,00			0,50	
Álcool cetílico			1,00		
Luvigel EM		2,00		2,50	2,00
Polímero cruzado acrilato/ C10-30 acrilato de alquila	0,50	0,30	0,40	0,10	0,50
Goma de xantano		0,30	0,15		
Composto	SA	SA	SA	SA	SA
Benzoato de alquila C12-15	2,00	2,50			
Éter dicaprílico		4,00			
Butilenoglicol dicaprílico/dicáprico	4,00		2,00	6,00	
Carbonato de dicaprílico		2,00	6,00		

HIDRODISPERSÃO PÓS-SOL**Formulações**

(Quantidades)

	1	2	3	4	5
Dimeticona		0,50	1,00		
Feniltrimeticona	2,00		0,50		
PVP tricontanila	0,50		1,00		
Glicerina de etilhexila			1,00		0,80
Glicerina	3,00	7,50		7,50	8,50
Glicina de soja			1,50		1,00
Acetato de vitamina E	0,50		0,25		1,00
Alfa-glucosilrutina	0,60			0,25	
EDTA trissódico		0,01	0,05		0,10
Etanol	1,00	10,00	8,00	12,00	9,00
Perfume	0,20		0,05	0,40	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

EMULSÕES WO**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Copoliol cetildimeticona		2,50		4,00	
Poligliceril-2-dipoliidroxiestearato	5,00				4,50
PEG-30-dipoliidroxiestearato			5,00		
Composto	SA	SA	SA	SA	SA
Aminobenzofenona (por exemplo, UVINUL A PLUS™)	2,00	1,50	0,75	1,00	2,10
Dióxido de titânio-microfino	1,00		3,00		3,50
Óxido de zinco-microfino		0,90		0,25	
Óleo mineral		12,00	10,00		8,00
Benzoato de alquila C12-15				9,00	

EMULSÕES WO**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Éter dicaprílico	10,00				7,00
Butilenoglicol dicaprílico/dicáprico			2,00	8,00	4,00
Carbonato de dicaprílico	5,00		6,00		
Dimeticona		4,00	1,00	5,00	
Ciclometicona	2,00	25,00			2,00
Manteiga de carité			3,00		
Vaselina		4,50			
Copolímero de hexadeceno PVP	0,50			0,50	1,00
Glicerina de etilhexila		0,30	1,00		0,50
Glicerina	3,00	7,50		7,50	8,50
Glicina de soja		1,00	1,50		1,00
MgSO ₄	1,00	0,50		0,50	
MgCl ₂			1,00		0,70
Acetato de vitamina E	0,50		0,25		1,00
Palmitato de ascorbila	0,50			2,00	
Fucogel 1000				3,50	7,00
Hidantoína DMDM		0,60	0,40	0,20	
Metilparabeno	0,50		0,25	0,15	
Fenoxietanol	0,50	0,40		1,00	
EDTA trissódico	0,12	0,05		0,30	
Etanol	3,00		1,50		5,00
Perfume	0,20		0,40	0,35	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

EMULSÕES ESTABILIZADAS SÓLIDAS**Formulações****(EMULSÕES "PICKERING")****(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Óleo mineral			16,00	16,00	
Octildodecanol	9,00	9,00	5,00		
Triglicerídeo caprílico/cáprico	9,00	9,00	6,00		
Benzoato de alquila C12-15				5,00	8,00
Butileno glicol dicaprílico/dicáprico					8,00
Éter dicaprílico	9,00			4,00	
Carbonato de dicaprílico		9,00			
Hidroxiestearato de hidroxi octacosanila	2,00	2,00	2,20	2,50	1,50
Hectorita disteardiamônio	1,00	0,75		0,50	0,25
Cera Microcristalina + parafina líquida		0,35			5,00
Hidroxipropil metilcelulose			0,10		0,05
Dimeticona					3,00
Composto	SA	SA	SA	SA	SA
Dióxido de titânio + alumina + simeticona + água		3,00			
Dióxido de titânio + trimetoxicaprililsilano		2,00	4,00	2,00	4,00
Dimetil sililato de sílica	2,50			6,00	2,50
Nitrito de boro			1,00		
Polímero - amido metafosfato de sódio	2,00				
Amido de tapioca		0,50			
Cloreto de sódio	5,00	7,00	8,50	3,00	4,50
Glicerina				1,00	
EDTA trissódico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Acetato de vitamina E	5,00	10,00	3,00	6,00	10,00
Palmitato de ascorbila	1,00	1,00		1,00	
Metilparabeno		0,60			0,20
Propilparabeno					0,20

EMULSÕES ESTABILIZADAS SÓLIDAS**Formulações****(EMULSÕES "PICKERING")****(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Fenoxietanol			0,20		
Diisetionato de hexamidina			0,40	0,50	0,40
Diazolidinil Uréia					0,08
Etanol			0,23	0,20	
Perfume	5,00		3,00	4,00	
Água	0,20		0,30	0,10	
	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

BASTÕES**Formulações****(Quantidades)**

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Triglicerídeo caprílico/cáprico	12,00	10,00	6,00	
Octildodecanol	7,00	14,00	8,00	3,00
Butileno glicol dicaprílico/dicáprico				12,00
Tetraisoestearato de pentaeritritila	10,00	6,00	8,00	7,00
Diisoestearato de poligliceril-3	2,50			
Poliaciladipato-2 de bis-diglicerila	9,00	8,00	10,00	8,00
Álcool cetearílico	8,00	11,00	9,00	7,00
Miristato de miristila	3,50	3,00	4,00	3,00
Cera de abelha	5,00	5,00	6,00	6,00
Cera de carnaúba	1,50	2,00	2,00	1,50
Cera de Alba	0,50	0,50	0,50	0,40
Estearato de alquila C16-40		1,50	1,50	1,50
Composto	SA	SA	SA	SA
Aminobenzofenona (por exemplo, UVI-	2,00	1,50	0,75	9,00

BASTÕES**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
NUL A PLUS™)				
Dióxido de titânio-microfino	1,00		3,00	
Óxido de zinco-microfino		1,00		0,25
Acetato de vitamina E	0,50	1,00		
Palmitato de ascorbila	0,05		0,05	
<i>Buxux Chinensis</i>	2,00	1,00		1,00
Perfume, BHT	0,10	0,25		0,35
<i>Ricinus Communis</i>	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

EMULSÃO PIT AUTOBRONZE-**Formulações****ADORA**

(Quantidades)

	1	2	3	4	5	6	7	8
Monoestearato de glicerina SE	0,50	2,00	3,00	5,00		0,50	4,00	
Isoestearato de glicerila					3,50	4,00	2,00	
Isoceteth-20		0,50			2,00			
Ceteareth-12		5,00		1,00			3,50	5,00
Ceteareth-20		5,00		1,00				3,50
Estearato de PEG-100				2,80		2,30	3,30	
Álcool cetílico	5,20		1,20	1,00	1,30		0,50	0,30
Palmitato de cetila	2,50	1,20		1,50		0,50		1,50
Copoliol de dimeticona cetila				0,50		1,00		
Poligliceril-2				0,75	0,30			
Composto	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA	SA
Dihidroxiacetona			3,00	5,00			4,00	
Aminobenzofenona (por exem-	2,00	1,50	0,75	1,00	2,10	4,50	5,00	2,10

EMULSÃO PIT AUTOBRONZE-

Formulações

ADORA

(Quantidades)

[illegible]

ÓLEO GÉIS**Formulações**

(Quantidades)

MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4
Triglicerídeo caprílico/cáprico	12,00	10,00	6,00	
Octildodecanol	7,00	14,00	8,00	3,00
Butileno glicol dicaprílico/dicáprico				12,00
Tetraisoestearato de pentaeritritila	10,00	6,00	8,00	7,00
Diisoestearato de poligliceril-3	2,50			
Poliaciladipato-2 de bis-diglicerila	9,00	8,00	10,00	8,00
Miristato de miristila	3,50	3,00	4,00	3,00
Bentona -34	5,00	5,00	6,00	6,00
Carbonato de propileno	15,00	20,00	18,00	19,50
Composto	SA	SA	SA	SA
Acetato de vitamina E	0,50	1,00		
Palmitato de ascorbila	0,05		0,05	
Buxux Chinensis	2,00	1,00		1,00
Perfume, BHT	0,10	0,25		0,35
Ricinus Communis	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

- Em ainda outras modalidades, a presente invenção compreende pelo menos um pigmento inorgânico. Em algumas modalidades preferidas, estes pigmentos inorgânicos são com base em óxidos de metal e/ou outros compostos de metal solúveis ou levemente insolúveis em água, incluindo mas não limitados a compostos como óxidos de zinco (ZnO), titânio (TiO₂), ferro (por exemplo, Fe₂O₃), zircônio (ZrO₂), sílica (SiO₂), manganês (por exemplo, MnO), alumínio (Al₂O₃), cerio (por exemplo, Ce₂O₃), e óxidos misturados destes óxidos, assim como misturas dos mesmos. Em algumas modalidades, os óxidos de metal são de tipo microfino, enquanto em outras moda-

lidades, os óxidos de metal são de tipo de pigmento. Em outras modalidades, os óxidos de metal são uma mistura de tipos microfinos e pigmentos.

Em modalidades adicionais, os pigmentos inorgânicos são revestidos (isto é, eles são tratados na superfície). Em algumas modalidades particularmente preferidas, a superfície é revestido com uma película hidrofóbica fina. Em algumas outras modalidades particularmente preferidas, a superfície é revestida com um película hidrofílica fina. Em ainda modalidades adicionais, a presente invenção provê composições compreendendo vários constituintes de maquiagem e maquiagens. Por exemplo, em algumas modalidades, a presente invenção provê vários corantes e/ou pigmentos. Em algumas modalidades, pigmentos utilizáveis incluem, mas não são limitados a dióxido de titânio, mica, óxidos de ferro (por exemplo, Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , $\text{FeO}(\text{OH})$, etc.) e/ou óxido estanoso. A presente invenção ainda provê corantes, incluindo mas não limitados a carmine, azul, óxido de cromo, ultramarinho e/ou magnésio púrpura. Os corantes e pigmentos de algumas modalidades mais preferidas são conhecidos dos versados na técnica e previamente providos (vide, por exemplo, Colour Index Nummern (CIN), Rowe Colour Index, terceira edição, Society of Dyers and Colourists, Bradford, England [1971]).

Em modalidades adicionais, pigmentos perolescentes com base em mica/óxido de metal encontram uso, como descrito acima. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a estes pigmentos particulares, como pigmentos perolescentes adicionais encontram uso em várias modalidades da presente invenção.

A seguintes formulações apresentam exemplos adicionais de uso da presente invenção.

	Formulação (Quantidades)				
	1	2	3	4	5
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)					
Carbômero de sódio		0,2			
Polímero cruzado acrilatos/ de $\text{C}_{10}\text{-C}_{30}$ acrilato de alquila	0,3	0,2	0,6		

	Formulação (Quantidades)				
	1	2	3	4	5
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)					
Hidroxipropil celulose				1,0	1,50
Goma de xantano		0,6	0,2	1,0	1,0
Composto	0,5	0,1	0,01	0,01	1,0
Butamidotriazona dioctila	2,0	2,0	1,0		
Etilhexil triazona	4,0	4,0	5,0		
Anisol triazina	1,0	0,5		2,0	2,5
Bisociltiazol				6,0	
Drometrisol trissiloxano					
Ácido sulfônico fenilbenzimidazila	2,0			1,0	
Bisimidazilato				1,0	
Ácido tereftalilideno dicânfora sulfônico				0,2	
Metoxicinamato de etilhexila	7,5	10,0		5,0	
Octocrileno					5,0
Dimeticona-dietilbenzalmalonato				4,0	
Salicilato de etilhexila					
Homossalato					
Metoxidibenzoilmetano de butila	1,0	1,0	4,0		
Dióxido de titânio	1,0	4,0			
Óxido de zinco				4,0	
Triglicerídeo caprílico/cáprico			2,0		
Coco-glicerídeo hidrogenado			3,0		
Benzoato de alquila C12-15	2,0	2,5	3,0		
Éter dicaprílico		4,0			
Butilenoglicol dicaprílico/dicáprico	4,0		2,0	6,0	

	Formulação (Quantidades)				
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Carbonato de dicaprílico		2,0			
Cetil dimeticona	2,0	0,5	1,0		
Manteiga de carité		2,0			
Copolímero de hexadeceno PVP	0,5		0,05	0,5	
Glicerina	3,0	7,5		7,5	2,5
Tocoferol		0,5	0,75		0,2
EDTA trissódico	1,0	0,5	0,5	1,0	1,5
Citrato de sódio		0,2			
Ácido cítrico		0,1		0,1	0,1
Hidantoína DMDM		0,6		0,2	
Metilparabeno	0,5		0,3	0,15	
Fenoxietanol	0,5	0,4	0,4	1,0	0,60
Etanol	3,0	2,0	3,0		1,0
Perfume	0,2			0,2	0,2
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

	Formulações (Quantidades)				
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Carbômero de sódio	0,5			1,5	
Polímero cruzado de acrilatos /C ₁₀ -C ₃₀ acrilato de alquila		0,4	0,1		0,75
Hidroxipropil celulose			0,5		0,25
Goma de xantano	0,2	0,4			
Composto	0,5	0,1	0,01	0,01	1,0

	Formulações (Quantidades)				
	1	2	3	4	5
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)					
Diocetil butamidotriazona	1,0		2,0		
Etilhexil triazona		2,0		2,0	
Anisol triazina	1,0	0,2	3,0	1,0	
Bisocetiltriazol					8,0
Trisiloxano drometrizol					4,0
Ácido sulfônico fenilbenzmidazol		1,5			
Bisimidazilato			1,5		
Ácido tereftalilideno dicânfora sulfônico					0,5
Metoxicinamato de etilhexila		7,5	5,0	10,0	
Octocrileno	10,0		5,0		5,0
Dietilbenzalmalonato de dimeticona					2,5
Salicilato de etilhexila			3,5	5,0	
Homossalato			4,0		
Metoxidibenzoilmetano de butila	0,5				
Dióxido de titânio	1,5	2,0	1,0		2,5
Óxido de zinco			1,0		0,5
Triglicerídeo caprílico/cáprico					
Coco-glicerídeo hidrogenado					
Benzoato de alquila C12-15					5,0
Éter dicaprílico					7,5
Butilenoglicol dicaprílico/dicáprico					
Carbonato de dicaprílico		7,5			
Cetil dimeticona					
Manteiga de carité					3,0

	Formulações (Quantidades)				
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5
Copolímero de hexadeceno PVP	0,5		0,75		1,0
Glicerina	5,0		10,0		
Tocoferol	0,3		1,5		1,0
EDTA trissódico	0,5		0,1	0,5	
Citrato de sódio			0,3		
Ácido cítrico			0,15		
Hidantoína DMDM				0,3	0,15
Metilparabeno		0,4			
Fenoxietanol		1,0			
Etanol	7,5		5,0		7,0
Perfume		0,25		0,2	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

	Formulações (Quantidades)					
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6
Carbômero de sódio	0,5	1,5	1,0			0,5
Polímero cruzado de acrilatos /C ₁₀ -C ₃₀ acrilato de alquila	1,0			0,75	1,0	
Hidroxipropil celulose			0,4	1,0		1,0
Goma de xantano		0,6	0,2	1,0	1,0	
BBI	4,0	0,5	3,0	2,0	4,0	1,5
Butamidotriazona dioctila	2,0	2,0		2,0		1,0

	Formulações					
	(Quantidades)					
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6
Etilhexil triazona		4,0	5,0	4,0		
Anisol triazina	1,0			1,0	2,5	1,0
Bisociltiazol			4,0			
Trissiloxano drometrizol		3,0				
Ácido fenilbenzimidazol sulfônico	2,0			1,0		
Bisimidazilato			1,5			3,5
Ácido tereftalilideno dicânfora sulfônico				0,2		1,0
Metoxicinamato de etilhexila		10,0		5,0		
Octocrilen	10,0				5,0	
Dimeticona-dietilbenzalmalonato				4,0		
Salicilato de etilhexila						5,0
Homossalato				5,0		
Metóxi-dibenzoilmetano de butila	1,0	1,0	4,0			0,5
Dióxido de titânio	1,0	4,0				1,5
Óxido de zinco				4,0		
Triglicerídeo caprílico/cáprico			2,0			
Parafina				1,0		
Benzoato de alquila C ₁₂ -C ₁₅	2,0	2,5	3,0			
Éter dicaprílico		4,0				
Isohexadeceno	4,0		2,0	6,0		
Carbonato de dicaprilila		2,0				
Adipato de dibutila	2,0	0,5	1,0			
Ciclometicona				3,0		
Óleo de jojoba		2,0				

	Formulações					
	(Quantidades)					
MATÉRIA-PRIMA (Designação INCI)	1	2	3	4	5	6
Copolímero de hexadeceno PVP	0,5		0,05	0,5		0,5
Butileno glicol	3,0	7,5		7,5	2,5	5,0
Palmitato de ascorbila		0,5	0,75		0,2	0,3
Octoxiglicerina		1,0		0,5		1,0
Glicina de soja			2,0			1,5
EDTA trissódico	1,0	0,5	0,5		1,5	0,5
Ácido cáustico	1,0	0,2	0,25			
Carbamato de iodopropil butila		0,6		0,2		
Fenoxietanol		0,4		1,0		
Etanol	5,0	2,0	7,0			
Perfume	0,2			0,2	0,2	
Água	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)	QS (100)

A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto após barba compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

LOÇÃO APÓS BARBA

5	%	Ingrediente	INCI
A	10,0	Luvitol EHO	Etilhexanoato de cetearila
	5,0	Acetato de vitamina A	Acetato de tocoferila
	1,0	Bisabolol rac.	Bisabolol
	0,1	Perfume	
10	0,3	Carbopol Ultrez 21	Polímero cruzado de acrilatos /C10-30 acrilato de alquila
B	15,0	Etanol	Álcool
	1,0	D-Pantenol USP	Pantenol
	3,0	Glicerina 87%	Glicerina

0,1	Trietanolamina "care"	Trietanolamina
SA	Composto	
QS	Água dem.	Aqua dem.

- 5 Produção: Pesar os componentes de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar bem.

Valores de medida:

Viscosidade: 18 500mPa s Brookfield RVD II+

Valor pH: 5,8

- 10 A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto após barba compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

PRÉ-BARBA

	%	Ingrediente	INCI
15	80	Etanol	Álcool
	3,0	Acetato de vitamina A	Acetato de tocoferila
	1,0	Bisabolol rac.	Bisabolol
	0,2	Perfume	
	0,1	Mentol	Mentol
20	4,0	Luvitol EHO	Etilhexanoato de cetearila
	2,0	Eutanol G	Octildodecanol
	2,0	Migliol 812	Triglicerídeo caprílico/cáprico
	2,0	D-Pantenol USP	Pantenol
	2,0	Destilado Witch Hazel	Destilado de Hamamelis
25			Virginiana (Witch Hazel)
	2,0	Óleo de jojoba	Óleo de semente (jojoba)
			Simmondsia Chinensis
	SA	Composto	

Produção: Pesar os componentes de fase A e dissolver os mesmos claramente.

- 30 A fórmula para pós-barba e pré-barba apresentada acima contém BBI-AV suficiente (composto) para prover o(s) efeito (s) desejado(s). Em algumas modalidades, a concentração de BBI-AV está na faixa de cerca de 1.000 ppm a cerca de 10.000 ppm. Nas seguintes formulações, as concen-

trações típicas de BBI-AV usadas na faixa de cerca de 100 ppm a cerca de 1.000 ppm ou de cerca de 1.000 ppm a cerca de 10.000 ppm. No entanto, não se pretende que a presente invenção seja limitada a esta faixa de concentração específica, como outras concentrações encontram uso em outras modalidades da presente invenção.

A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto pós-sol compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

LOÇÃO PÓS-SOL

		%	Ingrediente	INCI
10	A	0,4	Carbopol 1342	Polímero cruzado de acrilatos /C10-30 acrilato de alquila
		15,0	Luvitol EHO	Etilhexanoato de cetearila
		0,2	Bisabolol rac.	Bisabolol
		1,0	Acetato de vitamina A	Acetato de tocoferila
15		q.s.	Perfume	
	B	1,0	D-Pantenol USP	Pantenol
		15,0	Etanol 96%	Álcool
		3,0	Glicerina 87%	Glicerina
		SA	Composto	
20		64,2	Água dem.	Aqua dem.
	C	0,2	Trietanolamina care	Trietanolamina

Produção: Misturar os componentes de fase A. Dissolver a fase B e agitar na fase A enquanto homogeneizando. Neutralizar com a fase C e homogeneizar outra vez.

25 Valores de medida:

Viscosidade: 7 500mPa s Haake Viscoteste VT-02

Valor pH: 6,0

A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto limpador facial compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

30 Limpador Facial

	%	Ingrediente	INCI
A	10,0	Luvitol EHO	Etilhexanoato de cetearila

		10,0	Migliol 812	Triglicerídeo caprílico/cáprico
		1,5	Dow Corning 345 Fluido	Ciclopentassiloxano, ciclohexassilosano
5		2,0	Cremophor CO 40	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
	B	3,5	Luvigel EM	copolímero triglicerídeo caprílico/ cáprico, acrilato de sódio
	C	1,0	Acetato de vitamina A	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol rac.	Bisabolol
10		QS	Conservante	
		QS	Perfume	
	D	3,0	Luviquat "care"	Poliquaternio-44
		0,5	Luviquat Mono LS	Metossulfato de cocotrimônio
		0,5	Cremophor A 25	Ceteareth-25
15		0,2	D-Pantenol 50 P	Pantenol, propileno glicol
		4,0	1,2 Propileno glicol "care"	Propileno glicol
		0,1	Edeta BD	EDTA dissódico
		SA	Composto	
		QS	Água dem.	Aqua dem.

20 Produção: Dissolver a fase A, então agitar na fase B. Duplicar fase C. Dissolver a fase D, agitar as mesmas nas fases A+B+C combinadas, homogeneizar e agitar outra vez durante 15 min.

Valores de medida:

Viscosidade: 7 200mPa s Brookfield RVT

25 Valor pH: 5,8

A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto de pulverização do corpo de cuidado diário com SPF 8 compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

PULVERIZAÇÃO DO CORPO DE CUIDADO DIÁRIO – SPF 8

30	%	Ingrediente	INCI
A	3,0	Uvinul MC 80	Metoxicinamato de etilhexila
	2,0	Uvinul A Plus TM	Benzoato de dietilamino

			hidroxibenzoil hexila
	1,0	Luviquat UltraCare	Poliquaternio-44
	3,0	1,2 Propilenoglicol "care"	Propileno glicol
	2,0	D-Pantenol 50 P	Pantenol, propileno glicol
5	1,0	Dow Corning 345 Fluid	Ciclopentassiloxano, ciclohexassiloxano
	10,0	Eutanol G	Octildodecanol
	0,5	Luviskol K 30	PVP
	10,0	Migliol 812	Triglicerídeo caprílico/cáprico
10	3,0	Finsolv TN	Benzoato de alquila C12-15
	3,0	Glicerina 87%	Glicerina
	1,0	Acetato de vitamina A	Acetato de tocoferila
	0,3	Bisabolol rac. Composto	Bisabolol
15	QS	Etanol	Álcool

Produção: Pesar os componentes de fase A e dissolver os mesmos claramente.

Valores de medida:

SPF: 8 Colipa Task Force "Medida de Proteção Solar"

20 A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto de loção de cuidado pessoal solar de uso diário com SPF 27 compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

LOÇÃO CUIDADO SOLAR - SPF 27

		%	Ingrediente	INCI
25	A	4,5	Uvinul MC 80	Metoxicinamato de etilhexila
		2,0	Uvinul A Plus TM	Benzoato de dietilamino
				hidroxibenzoil hexila
		3,0	Uvinul N 539 T	Octocrileno
		2,5	Cosmacol EMI	Malato de Di-C12-13 alquila
30		0,5	Acetato de vitamina E	Acetato de tocoferila
		4,0	Tego Care 450	Distearato de poligliceril-3 metil glicose

5	B	3,5	Cetiol SN Deo	Isononanoato de cetearila
		1,0	Ganex V-220	copolímero de VP/eicoseno
		5,0	Isohexadecano	Isohexadecano
		2,5	Cosmacol EMI	Malato de Di-C12-13 alquila
		3,0	Uvinul TiO ₂	Dióxido de titânio, trimetoxicaprilsilano
10	C	5,0	Glicerina 87%	Glicerina
		1,0	Lanette E	Cetearil sulfato de sódio
		0,5	Keltrol	Goma de xantano
		60,7	Água dem.	Aqua dem.
	D	SA	Composto	
		1,0	Phenonip	Fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno,
		0,3	Bisabolol rac.	Bisabolol

- 15 **Produção:** Aquecer as fases A e B separadamente a cerca de 80°C. Agitar a fase B na fase A enquanto homogeneizando. Aquecer a fase C a cerca de 80°C e agitar as mesmas às fases A+B combinadas enquanto homogeneizando. Resfriar a cerca de 40°C adicionar fase D e homogeneizar outra vez.

Valores de medida:

- 20 Viscosidade: 3 200mPa s Brookfield RVD II+

Valor pH: 6,0

SPF: 27 Colipa Task Force "Medida de Proteção Solar"

LOÇÃO DE CUIDADO SOLAR – SPF 24

		%	Ingrediente	INCI
25	A	2,0	Cremophor A 6	Ceteareth-6, álcool estearílico
		2,0	Cremophor A 25	Ceteareth-25
		3,0	Syncrowax HRC	Tribehenin
		2,0	Lanette O	Álcool cetearílico
		2,0	Luvitol EHO	Etilhexanoato de cetearila
30		5,0	Uvinul MC 80	Metoxicinamato de etilhexila
		1,0	Uvinul T 150	Etilhexil triazona
		1,0	Ganex V-220	copolímero de VP/eicoseno

		7,0	Miristato de isopropila	Miristato de isopropila
	B	5,0	Z-Cote HP-1	Óxido de zinco, trietoxicaprililsilano
5	C	0,2	Keltrol	Acrilato de hidroxietila/acrilóil- dimetila de sódio copolímero taurato, esqualeno, polissorbato 60
		0,2	Edeta BD	EDTA dissódico
		5,0	1,2 Propileno glicol "care"	Propileno glicol
10		0,5	D-Pantenol USP	Pantenol
		61,9	Água dem.	Aqua dem.
	D	SA	Composto	
15		0,5	Euxyl K 300	Fenoxietanol, metilparabeno, butilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, isobutilparabeno
		1,0	Acetato de vitamina E	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol rac.	Bisabolol

Produção: Aquecer a fase A a 80°C, adicionar a fase B e homogeneizar durante 3 min. Aquecer a fase C a cerca de 80°C, e agitar as mesmas nas fases A+B combinadas enquanto homogeneizando. Resfriar a cerca de 40°C, adicionar a fase D, e homogeneizar.

Valores de medida:

Viscosidade: 5 000mPa s Brookfield RVD II+

25 Valor pH: 7,5

SPF: 24 Colipa Task Force "Medida de Proteção Solar"

A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto de emulsão filtro solar com SPF 28 compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

EMULSÃO FILTRO SOLAR – SPF 28

30		%	Ingrediente	INCI
	A	3,5	Cremophor A 6	Ceteareth-6, álcool estearílico
		1,5	Cremophor A 25	Ceteareth-25

5		7,5	Uvinul MC 80	Metoxicinamato de etilhexila
		2,0	Uvinul A Plus TM	Benzoato de dietilamino
				hidroxibenzoil hexila
		2,0	Dow Corning 345 Fluid	Ciclopentassiloxano,
				ciclohexassiloxano
10		0,5	Cera de abelhas 3044 PH	Cera de abelhas
		3,0	Lanette O	Álcool cetearílico
		10,0	Migliol 812	Triglicerídeo caprílico/cáprico
	B	5,0	T-Lite SF-S	Dióxido de titânio, sílica,
				meticona, alumina
15	C	3,0	Glicerina 87%	Glicerina
		0,2	Edeta BD	EDTA dissódico
		0,3	Keltrol T	Goma de xantano
		1,0	Plantacare 2000	Glucosídeo de decila
		2,0	D-Pantenol 50 P	Pantenol, propileno glicol
20		57,3	Água dem.	Aqua dem.
	D	SA	Composto	
		1,0	Acetato de vitamina A	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol rac.	Bisabolol
		QS	Perfume	
		QS	Conservante	

Produção: Aquecer fase A a 80°C, adicionar a fase B e homogeneizar durante 3 min. Aquecer a fase C a cerca de 80°C, e agitar as mesmas às fases A+B combinadas enquanto homogeneizando. Resfriar a cerca de 40°C, adicionar a fase D e homogeneizar.

Valores de medida:

Viscosidade: 7 500mPa s Brookfield RVD II+

Valor pH: 6,6

SPF: 28 Colipa Task Force "Medida de Proteção Solar"

A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto de bálsamo para os pés compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

BÁLSAMO PARA OS PÉS

		% Ingrediente	INCI
5	A	2,0 Cremophor A 6	Ceteareth-6, álcool estearílico
		2,0 Cremophor A 25	Ceteareth-25
		5,0 Luvitol EHO	Etilhexanoato de cetearila
		4,0 Lanette 16	Álcool cetílico
		4,0 Cutina Gms	Estearato de glicerila
		5,0 Óleo de parafina	Óleo mineral
		0,2 Mentol	Mentol
10	B	0,5 Cânfora	Cânfora
		70,3 Água dem.	Aqua dem.
		QS Conservante	
15	C	SA Composto	
		1,0 Bisabolol rac.	Bisabolol
		1,0 Acetato de vitamina E	Acetato de tocoferila
	D	5,0 Extrato de hamamélia	Extrato de hamamélia

Produção: Aquecer as fases A e B a cerca de 80°C separadamente. Agitar a fase B na fase A enquanto homogeneizando. Resfriar a cerca de 40°C, adicionar a fases C e D e homogeneizar outra vez. Resfriar em temperatura ambiente.

Valores de medida:

Viscosidade: 20 500mPa s Brookfield RVD II+

Valor pH: 6,0

A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto em gel refrescante dos pés compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

GEL REFRESCANTE PARA OS PÉS

		% Ingrediente	INCI
30	A	0,6 Carbopol Ultrez 21	Polímero cruzado de acrilatos /C10-30 acrilato de alquila
		45,9 Água dem.	Aqua dem.
	B	1,0 Bisabolol rac.	Bisabolol
		0,5 Farnesol	Farnesol

5	q.s.	Perfume	
	4,5	Cremophor CO 40	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
	1,0	Neutrol TE	Tetrahidroxipropil etilenodiamina
	1,5	Mentol	Mentol
	SA	Composto	
	45,0	Etanol 96%	Álcool
	QS	FD&C Blue Nº 1	C.I. 42 090, FD&C Blue nº 1

- 10 Produção: Fase A: Interdispersar o carbopol e deixar o mesmo assentar no fundo do béquer. Dissolver a fase B e agitar na fase A.

Valores de medida:

Viscosidade: 14 500mPa s Brookfield RVD II+

Valor pH: 7,5

- 15 A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto em gel condicionador para a pele compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

GEL CONDICIONADOR PARA A PELE

		%	Ingrediente	INCI
20	A	3,6	Cremophor CO 40	PEG-40 óleo de rícino hidro- genado
		15,0	Etanol	Álcool
		0,1	Bisabolol rac.	Bisabolol
		0,5	Acetato de vitamina E	Acetato de tocoferila
		QS	Perfume	
25	B	3,0	D-Pantenol USP	Pantenol
		0,6	Carbopol 940	Carbômero
		SA	Composto	
		76,4	Água dem.	Aqua dem.
	C	0,8	Trietanolamina care	Trietanolamina

- 30 Produção: Dissolver a fase A claramente. Permitir fase B para intumescer e neutralizar com a fase C. Agitar a fase A as mesmas a fase B neutralizada e homogeneizar.

Valores de medida:

Viscosidade: 57 600mPa s Brookfield RVD II+

Valor pH: 7,7

A seguinte fórmula provê um exemplo de uma emulsão A/O
5 compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

EMULSÃO A/O

	%	Ingrediente	INCI
A	6,0	Cremophor WO 7	PEG-7 óleo de rícino hidrogenado
10	8,0	Luvitol EHO	Etilhexanoato de cetearila
	5,0	Miristato de isopropila	Miristato de isopropila
	15,0	Óleo de parafina	Óleo mineral
	0,3	Estearato de magnésio	Estearato de magnésio
	0,3	Estearato de alumínio	Estearato de alumínio
15	2,0	Elfacos ST9	PEG-45/copolímero dodecil glicol
B	5,0	Glicerina 87%	Glicerina
	0,7	Sulfato de magnésio-7-hidrato	Sulfato de magnésio
	56,6	Água dem.	Aqua dem.
20	C	SA	Composto
	0,5	Acetato de vitamina E	Acetato de tocoferila
	0,6	Bisabolol rac.	Bisabolol

Produção: Aquecer as fases A e B separadamente a cerca de 85°C. Agitar a fase B na fase A e homogeneizar. Resfriar a cerca de 40°C enquanto agitação, adicionar a fase C e homogeneizar outra vez. Resfriar em temperatura ambiente.
25

Valores de medida:

Viscosidade: 37 500mPa s Brookfield RVD II+

A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto de emulsão O/A compreendendo o BBI-AV da presente invenção.
30

EMULSÃO O/A

		%	Ingrediente	INCI
5	A	1,7	Cremophor A 6	Ceteareth-6, álcool estearílico
		0,7	Cremophor A 25	Ceteareth-25
		2,0	Uvinul A Plus™	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
		2,0	Abil B 8843	PEG-14 dimeticona
		3,6	Lanette O	Álcool cetearílico
10	B	6,0	Uvinul MC 80	Metoxicinamato de etilhexila
		2,0	Cetiol B	Adipato de dibutila
		5,0	Glicerina 87%	Glicerina
		0,2	Edeta BD	EDTA dissódico
		1,0	D-Pantenol 75 W	Pantenol
15	C	q.s.	Conservante	
		68.8	Água dem.	Aqua dem.
		4,0	Luvigel EM	Triglicerídeo caprílico/cáprico, copolímero acrilatos de sódio
		0,2	Fosfato de ascorbila de sódio	Fosfato de ascorbila de sódio
20	D	1,0	Acetato de vitamina E	Acetato de tocoferila
		0.2	Bisabolol rac.	Bisabolol
		q.s.	Hidróxido de sódio 10% aq. p/p	Hidróxido de sódio
		1,0	RetiSTAR	Triglicerídeo caprílico/cáprico, ascorbato de sódio, tocoferol, retinol
25	E			
	F			
	SA		Composto	

Produção: Aquecer fase A e B separadamente a cerca de 80°C. Agitar a fase B na fase A e homogeneizar. Agitar a fase C nas fases A+B combinadas e homogeneizar. Resfriar a cerca de 40°C, adicionar a fase D, então ajudar o valor pH com a fase E a 6,5. Adicionar a fase F e homogeneizar. Resfriar em temperatura ambiente.

Valores de medida:

Viscosidade: 37 500mPa s Brookfield RVD II+

Valor pH: 6,3

A seguinte fórmula provê um exemplo de um produto em creme
 5 protetor para o dia compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

CREME PROTETOR PARA O DIA

	%	Ingrediente	INCI
10	A	1,7 Cremophor A 6	Ceteareth-6, álcool estearílico
		0,7 Cremophor A 25	Ceteareth-25
		2,0 Uvinul A Plus TM	Benzoato de dietilamino
			hidroxibenzoil hexila
		2,0 Abil B 8843	PEG-14 dimeticona
		3,6 Lanette O	Álcool cetearílico
		6,0 Uvinul MC 80	Metoxicinamato de etilhexila
	15	2,0 Cetiol B	Adipato de dibutila
	B	5,0 Glicerina 87%	Glicerina
		0,2 Edeta BD	EDTA dissódico
20		1,0 D-Pantenol 75 W	Pantenol
		QS Conservante	
		69,6 Água dem.	Aqua dem.
	C	4,0 Luvigel EM	Triglicerídeo caprílico/cáprico, copolímero acrilato de sódio
	D	1,0 Fosfato de ascorbila de sódio	Fosfato de ascorbila de sódio
25		1,0 Acetato de vitamina E	Acetato de tocoferila
	SA	Composto	
		0,2 Bisabolol rac.	Bisabolol
	E	QS Hidróxido de sódio	Hidróxido de sódio 10% aq. p/p

Produção: Aquecer fase A e B separadamente a cerca de 80°C. Agitar a fa-
 30 se B na fase A e homogeneizar. Agitar a fase C nas fases A+B combinadas
 e homogeneizar. Resfriar a cerca de 40°C, adicionar a fase D, então ajudar o
 valor pH com a fase E a 6,5 e homogeneizar. Resfriar em temperatura ambi-

ente.

Valores de medida:

Viscosidade: 24 000mPa s Brookfield RVD II+

Valor pH: 6,4

- 5 As seguintes fórmulas provêm exemplos de produtos de cuidado do cabelo compreendendo o BBI-AV da presente invenção.

CONDICIONADORES DE CABELO

	%	Ingredientes (INCI)
10	A 10,0	Copolímero PVP/VA
	0,2	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
	0,2	Ceteareth-25
	0,5	Copoliol dimeticona
	QS	Perfume
15	10,0	Álcool
	A SA	Composto
	68,1	Aqua dem.
	B 10,0	Propano/butano
	%	Ingredientes (INCI)
20	A 10,0	Copolímero PVP/VA
	0,2	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
	0,2	Ceteareth-25
	0,5	Copoliol dimeticona
	QS	Perfume
25	10,0	Álcool
	A SA	Composto
	64,1	Aqua dem.
	B 10,0	Propano/butano

Produção: Adicionar todos os compostos à fase A e agitar para homogeneizar. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase B.

30 CONDICIONADORES ESPUMANTES

	%	Ingredientes (INCI)
A	1,0	Poliquaternio-4

		0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
		Composto	
		QS	Perfume
		QS	Conservante
5		91,5	Aqua dem.
	B	6,0	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
	A	1,0	Poliquaternio-4
		0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
10		SA	Composto
		QS	Perfume
		QS	Conservante
		87,5	Aqua dem.
	B	6,0	Propano/butano
15	<u>Produção:</u> Adicionar todos os compostos à fase A e agitar para homogeneizar. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase B.		

CONDICIONADORES ESPUMANTES

		%	Ingredientes (INCI)
	A	1,0	Poliquaternio-11
20		0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
		Composto	
		QS	Perfume
		QS	Conservante
		91,5	Aqua dem.
25	B	6,0	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
	A	1,0	Poliquaternio-11
		0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
		SA	Composto
30		QS	Perfume
		QS	Conservante
		87,5	Aqua dem.

B 6,0 Propano/butano

Produção: Adicionar todos os compostos à fase A e agitar para homogeneizar. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase B.

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

5		%	Ingredientes (INCI)
	A	0,5	Laureth-4
		QS	Perfume
	B	77,3	Aqua dem.
		10,0	Poliquaternio-28
10			Composto
		0,5	Copoliol dimeticona
		0,2	Ceteareth-25
		0,2	Pantenol
		0,1	PEG-25 PABA
15		0,2	Hidroxietilcelulose
	C	10,0	HFC 152 A
		%	Ingredientes (INCI)
	A	0,5	Laureth-4
		QS	Perfume
20	B	73,3	Aqua dem.
		10,0	Poliquaternio-28
		SA	Composto
		0,5	Copoliol dimeticona
		0,2	Ceteareth-25
25		0,2	Pantenol
		0,1	PEG-25 PABA
		0,2	Hidroxietilcelulose
	C	10,0	HFC 152 A

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

% **Ingredientes (INCI)**

5	A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio	
		QS	Perfume	
	B	78,5	Aqua dem.	
		6,7	Copolímero de acrilatos	
		0,6	AMP	
		SA	Composto	
		0,5	Copoliol dimeticona	
		0,2	Ceteareth-25	
		0,2	Pantenol	
		0,1	PEG-25 PABA	
10		0,2	Hidroxietilcelulose	
		C	10,0	HFC 152 A
		%	Ingredientes (INCI)	
	A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio	
		QS	Perfume	
	B	74,5	Aqua dem.	
		6,7	Copolímero de acrilatos	
		0,6	AMP	
		SA	Composto	
		0,5	Copoliol dimeticona	
0,2		Ceteareth-25		
0,2		Pantenol		
0,1		PEG-25 PABA		
20		0,2	Hidroxietilcelulose	
		C	10,0	HFC 152 A
	B	74,5	Aqua dem.	
		6,7	Copolímero de acrilatos	
		0,6	AMP	
		SA	Composto	
		0,5	Copoliol dimeticona	
		0,2	Ceteareth-25	
		0,2	Pantenol	
		0,1	PEG-25 PABA	
25		0,2	Hidroxietilcelulose	
		C	10,0	HFC 152 A
	B	74,5	Aqua dem.	
		6,7	Copolímero de acrilatos	
		0,6	AMP	
		SA	Composto	
		0,5	Copoliol dimeticona	
		0,2	Ceteareth-25	
		0,2	Pantenol	
		0,1	PEG-25 PABA	

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

ESPUMA MODELADORA DO PENTEADO

30	%	Ingredientes (INCI)
A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio
	QS	Perfume

	B	7,70	Poliquaternio-44
		SA	Composto
		QS	Conservante
		79,3	Aqua dem.
5	C	10,0	Propano/butano

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Ajustar o pH a 6 –7. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

ESPUMA MODELADORA DO PENTEADO

10		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,00	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
	B	72,32	Aqua dem.
		2,00	VP/acrilatos/copolímero metacrilato de laurila
15		0,53	AMP
		SA	Composto
		0,20	Ceteareth-25
		0,50	Pantenol
		0,05	Benzofenona-4
20		0,20	Amodimeticona, cloreto de cetrimônio, Trideceth-12
		15,00	Álcool
	C	0,20	Hidroxietilcelulose
	D	6,00	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
25	A	2,00	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
	B	68,32	Aqua dem.
		2,00	Copolímero VP/Acrilatos/ metacrilato de laurila
		0,53	AMP
30		SA	Composto
		0,20	Ceteareth-25
		0,50	Pantenol

		0,05	Benzofenona-4
		0,20	Amodimeticona, cloreto de cetrimônio, Trideceth-12
		15,00	Álcool
	C	0,20	Hidroxietilcelulose
5	D	6,00	Propano/butano

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Adicionar a fase C e homogeneizar outra vez. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com fase D.

10 ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,00	Cloreto de cetrimônio
		QS	Perfume
	B	67,85	Aqua dem.
15		7,00	Poliquaternio-46
	SA		Composto
		0,20	Ceteareth-25
		0,50	Pantenol
		0,05	Benzofenona-4
20		0,20	Amodimeticona, cloreto de cetrimônio, Trideceth-12
		15,00	Álcool
	C	0,20	Hidroxietilcelulose
	D	6,00	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
25	A	2,00	Cloreto de cetrimônio
		QS	Perfume
	B	63,85	Aqua dem.
		7,00	Poliquaternio-46
	SA		Composto
30		0,20	Ceteareth-25
		0,50	Pantenol
		0,05	Benzofenona-4

	0,20	Amodimeticona, cloreto de cetrimônio, Trideceth-12
	15,00	Álcool
C	0,20	Hidroxietilcelulose
D	6,00	Propano/butano

- 5 **Produção:** Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Adicionar a fase C e homogeneizar outra vez. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com fase D.

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

10		%	Ingredientes (INCI)
	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		85,5	Aqua dem.
	B	7,0	Poliestireno sulfonato de sódio
15		SA	Composto
		0,5	Brometo de cetrimônio
		QS	Conservante
	C	6,0	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
20	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		81,5	Aqua dem.
	B	7,0	Poliestireno sulfonato de sódio
		SA	Composto
25		0,5	Brometo de cetrimônio
		QS	Conservante
	C	6,0	Propano/butano

- Produção:** Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.
- 30

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

		%	Ingredientes (INCI)
5	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		92,0	Aqua dem.
	B	0,5	Poliquaternio-10
		1,0	Composto
0,5		Brometo de cetrimônio	
10	C	QS	Conservante
		6,0	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
88,0		Aqua dem.	
15	B	0,5	Poliquaternio-10
		5,0	Composto
		0,5	Brometo de cetrimônio
	C	QS	Conservante
		6,0	Propano/butano
20 <u>Produção:</u> Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.			
	%	Ingredientes (INCI)	
25	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		82,5	Aqua dem.
	B	10,0	Poliquaternio-16
		SA	Composto
0,5		Fosfato de hidroxietil cetildimônio	
30	C	QS	Conservante
	6,0	Propano/butano	

		%	Ingredientes (INCI)
	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		78,5	Aqua dem.
5	B	100	Poliquaternio-16
		SA	Composto
		0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
		QS	Conservante
	C	6,0	Propano/butano
10	Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.		

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

		%	Ingredientes (INCI)
15	A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
	B	84,0	Aqua dem.
		2,0	Quitosana
		SA	Composto
20		0,5	Copoliol dimeticona
		0,2	Ceteareth-25
		0,2	Pantenol
		0,1	PEG-25 PABA
	C	10,0	HFC 152 A
25		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
	B	80,0	Aqua dem.
		2,0	Quitosana
30		SA	Composto
		0,5	Copoliol dimeticona
		0,2	Ceteareth-25

0,2	Pantenol
0,1	PEG-25 PABA

C 10,0 HFC 152 A

- Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

XAMPUS

	%	Ingredientes (INCI)
10	A	30,0 Laureth sulfato de sódio
		6,0 Cocoanfoacetato de sódio
		6,0 Betaína de cocamidopropila
		3,0 Laureth sulfato de sódio, distearato glicol, cocamida MEA, Laureth-10
15	SA	Composto
		7,7 Poliquaternio-44
		2,0 Amodimeticona
	QS	Perfume
	QS	Conservante
20		1,0 Cloreto de sódio
		43,3 Aqua dem.
	B	QS Ácido cítrico
25		% Ingredientes (INCI)
	A	30,0 Laureth sulfato de sódio
		6,0 Cocoanfoacetato de sódio
		6,0 Betaína de cocamidopropila
		3,0 Laureth sulfato de sódio, distearato glicol, cocamida MEA, Laureth-10
		Composto
30		7,7 Poliquaternio-44
		2,0 Amodimeticona
	QS	Perfume
	QS	Conservante

1,0 Cloreto de sódio

39,3 Aqua dem.

B QS Ácido cítrico

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Ajustar o pH a 6-7 com ácido cítrico.

5

GÉIS PARA CHUVEIRO

	%	Ingredientes (INCI)
10	A 40,0	Laureth sulfato de sódio
	5,0	Glucosídeo de decila
	5,0	Betaína de cocamidopropila
	SA	Composto
	1,0	Pantenol
	QS	Perfume
	QS	Conservante
15	2,0	Cloreto de sódio
	46,0	Aqua dem.
	B QS	Ácido cítrico
	%	Ingredientes (INCI)
20	A 40,0	Laureth sulfato de sódio
	5,0	Glucosídeo de decila
	5,0	Betaína de cocamidopropila
	SA	Composto
	1,0	Pantenol
	QS	Perfume
	QS	Conservante
25	2,0	Cloreto de sódio
	42,0	Aqua dem.
	B QS	Ácido cítrico

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Ajustar o pH a 6-7 com ácido cítrico.

30

XAMPUS

	%	Ingredientes (INCI)
5	A 40,0	Laureth sulfato de sódio
	5,0	Sulfonato de C12-15 Pareth-15 de sódio
	5,0	Glucosídeo de decila
	QS	Perfume
	0,1	Fitantriol
10	44,6	Aqua dem.
	SA	Composto
	0,3	Poliquaternio-10
	1,0	Pantenol
	QS	Conservante
15	1,0	Laureth-3
	2,0	Cloreto de sódio
	%	Ingredientes (INCI)
	A 40,0	Laureth sulfato de sódio
	5,0	Sulfonato de C12-15 Pareth-15 de sódio
20	5,0	Glucosídeo de decila
	QS	Perfume
	0,1	Fitantriol
	40,6	Aqua dem.
	SA	Composto
25	0,3	Poliquaternio-10
	1,0	Pantenol
	QS	Conservante
	1,0	Laureth-3
	2,0	Cloreto de sódio

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Ajustar o pH a 6-7 com ácido cítrico.

30 **XAMPUS**

	%	Ingredientes (INCI)
A	15,00	Betaína de cocamidopropila

		10,00	Cocoanfodiacetato dissódico
		5,00	Polissorbato 20
		5,00	Glucosídeo de decila
		QS	Perfume
5		QS	Conservante
		SA	Composto
		0,15	Cloreto de hidroxipropiltrimônio guar
		2,00	Laureth-3
		58,00	Aqua dem.
10		QS	Ácido cítrico
	B	3,00	Distearato de PEG-150
		%	Ingredientes (INCI)
	A	15,00	Betaína de cocamidopropila
		10,00	Cocoanfodiacetato dissódico
15		5,00	Polissorbato 20
		5,00	Glucosídeo de decila
		QS	Perfume
		QS	Conservante
			Composto
20		0,15	Cloreto de hidroxipropiltrimônio guar
		2,00	Laureth-3
		54,00	Aqua dem.
		QS	Ácido cítrico
	B	3,00	Distearato de PEG-150

25 Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Ajustar o pH a 6-7. Adicionar a fase B e aquecer até o máximo de 40°C.

LOÇÕES CORPORAIS

		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,0	Ceteareth-25
30		2,0	Ceteareth-6, álcool estearílico
		3,0	Etilhexanoato de cetearila
		1,0	Dimeticona

		4,0	Álcool cetearílico
		3,0	Estearato de glicerila SE
		5,0	Óleo mineral
		4,0	Óleo de semente (Jojoba) Simmondsia Chinensis
5		3,0	Óleo mineral, álcool lanolínico
	B	5,0	Propileno glicol
		SA	Composto
		1,0	Pantenol
		0,5	Alumino silicato de magnésio
10		QS	Conservante
		65,5	Aqua dem.
	C	QS	Perfume
	D	QS	Ácido cítrico
		%	Ingredientes (INCI)
15	A	2,0	Cetareth-25
		2,0	Cetareth-6, álcool estearílico
		3,0	Etilhexanoato de cetearila
		1,0	Dimeticona
		4,0	Álcool cetearílico
20		3,0	Estearato de glicerila SE
		5,0	Óleo mineral
		4,0	Óleo de semente (jojoba) Simmondsia Chinensis
		3,0	Óleo mineral, álcool lanolínico
	B	5,0	Propileno glicol
25		SA	Composto
		1,0	Pantenol
		0,5	Aluminossilicato de magnésio
		QS	Conservante
		61,5	Aqua dem.
30	C	QS	Perfume
	D	QS	Ácido cítrico

Produção: Aquecer as fases A e B separadamente a aproximadamente 40°C. Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Adicionar a fase C na fase A e B combinada e homogeneizar outra vez. Ajustar o pH com fase D a 6 - 7. Homogeneizar por agitação e resfriar em temperatura ambiente.

5

LOÇÕES CORPORAIS

	%	Ingredientes (INCI)
10	A	6,0 PEG-7 óleo de rícino hidrogenado
		10,0 Etilhexanoato de cetearila
		5,0 Miristato de isopropila
		7,0 Óleo mineral
		0,5 Manteiga de carité (Butyrospermum Parkii)
		0,5 Estearato de alumínio
		0,5 Estearato de magnésio
	15	0,2 Bisabolol
		0,7 Quaternium-18-Hectorita
		B
20		5,0 Dipropileno glicol
		0,7 Sulfato de magnésio
		QS Conservante
		62,9 Aqua dem.
	C	QS Perfume
25		SA Composto
		% Ingredientes (INCI)
	A	6,0 PEG-7 óleo de rícino hidrogenado
		10,0 Etilhexanoato de cetearila
		5,0 Miristato de isopropila
		7,0 Óleo mineral
		0,5 Manteiga de carité (Butyrospermum Parkii)
		0,5 Estearato de alumínio
	30	0,5 Estearato de magnésio
		0,2 Bisabolol
		0,7 Quaternium-18-Hectorita

5	B	5,0	Dipropileno glicol
		0,7	Sulfato de magnésio
		QS	Conservante
		58,9	Aqua dem.
	C	QS	Perfume
		SA	Composto

Produção: Aquecer as fases A e B separadamente a aproximadamente 80°C. Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Resfriar a 40°C e adicionar fase C. Homogeneizar outra vez e resfriar em temperatura ambiente.

10

CONDICIONADORES DE CABELO

		%	Ingredientes (INCI)
15	A	10,0	Copolímero de PVP/VA
		0,2	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
		0,2	Ceteareth-25
		0,5	Copoliol dimeticona
		QS	Perfume
		10,0	Álcool
		SA	Composto
20	B	68,1	Aqua dem.
		10,0	Propano/butano
25	A	%	Ingredientes (INCI)
		10,0	Copolímero de PVP/VA
		0,2	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
		0,2	Ceteareth-25
		0,5	Copoliol dimeticona
		QS	Perfume
		10,0	Álcool
30	B	SA	Composto
		64,1	Aqua dem.
	B	10,0	Propano/butano

Produção: Adicionar todos os compostos à fase A e agitar para homogeneizar. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase B.

CONDICIONADORES ESPUMANTES

		%	Ingredientes (INCI)
5	A	1,0	Poliquaternio-4
		0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
		SA	Composto
		QS	Perfume
		QS	Conservante
10		91,5	Aqua dem.
	B	6,0	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
	A	1,0	Poliquaternio-4
		0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
15		SA	Composto
		QS	Perfume
		QS	Conservante
		87,5	Aqua dem.
	B	6,0	Propano/butano

20 Produção: Adicionar todos os compostos à fase A e agitar para homogeneizar. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase B.

CONDICIONADORES ESPUMANTES

		%	Ingredientes (INCI)
	A	1,0	Poliquaternio-11
25		0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
			Composto
		QS	Perfume
		QS	Conservante
		91,5	Aqua dem.
30	B	6,0	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
	A	1,0	Poliquaternio-11

	0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
	SA	Composto
	QS	Perfume
	QS	Conservante
5	87,5	Aqua dem.
B	6,0	Propano/butano

Produção: Adicionar todos os compostos à fase A e agitar para homogeneizar. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase B.

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

10		%	Ingredientes (INCI)
	A	0,5	Laureth-4
		QS	Perfume
	B	77,3	Aqua dem.
		10,0	Poliquaternio-28
15		SA	Composto
		0,5	Copoliol dimeticona
		0,2	Ceteareth-25
		0,2	Pantenol
		0,1	PEG-25 PABA
20		0,2	Hidroxietilcelulose
	C	10,0	HFC 152 A
		%	Ingredientes (INCI)
	A	0,5	Laureth-4
		QS	Perfume
25	B	73,3	Aqua dem.
		10,0	Poliquaternio-28
		SA	Composto
		0,5	Copoliol dimeticona
		0,2	Ceteareth-25
30		0,2	Pantenol
		0,1	PEG-25 PABA
		0,2	Hidroxietilcelulose

C 10,0 HFC 152 A

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

5 ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

		%	Ingredientes (INCI)
10	A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
	B	78,5	Aqua dem.
		6,7	Copolímero acrilatos
		0,6	AMP
		SA	Composto
		0,5	Copoliol dimeticona
		0,2	Ceteareth-25
		0,2	Pantenol
		0,1	PEG-25 PABA
		0,2	Hidroxietilcelulose
C	10,0	HFC 152 A	
	%	Ingredientes (INCI)	
20	A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
	B	74,5	Aqua dem.
		6,7	Copolímero de acrilatos
		0,6	AMP
		SA	Composto
		0,5	Copoliol dimeticona
		0,2	Ceteareth-25
		0,2	Pantenol
		0,1	PEG-25 PABA
		0,2	Hidroxietilcelulose
C	10,0	HFC 152 A	

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

5		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
	B	7,70	Poliquaternio-44
		SA	Composto
10		QS	Conservante
		79,3	Aqua dem.
	C	10,0	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio
15		QS	Perfume
	B	7,70	Poliquaternio-44
		SA	Composto
		QS	Conservante
		75,3	Aqua dem.
20	C	10,0	Propano/butano

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Ajustar o pH a 6 –7. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

25		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,00	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
	B	72,32	Aqua dem.
		2,00	copolímero VP/acrilatos/ metacrilato de laurila
30		0,53	AMP
		SA	Composto
		0,20	Ceteareth-25

		0,50	Pantenol
		0,05	Benzofenona-4
		0,20	Amodimeticona, cloreto de cetrimônio, Trideceth-12
		15,00	Álcool
5	C	0,20	Hidroxietilcelulose
	D	6,00	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,00	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
10	B	68,32	Aqua dem.
		2,00	Copolímero VP/acrilato/ metacrilato de laurila
		0,53	AMP
		SA	Composto
		0,20	Ceteareth-25
15		0,50	Pantenol
		0,05	Benzofenona-4
		0,20	Amodimeticona, cloreto de cetrimônio, Trideceth-12
		15,00	Álcool
	C	0,20	Hidroxietilcelulose
20	D	6,00	Propano/butano

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Adicionar a fase C e homogeneizar outra vez. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com fase D.

25 ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,00	Cloreto de cetrimônio
		QS	Perfume
	B	67,85	Aqua dem.
30		7,00	Poliquaternio-46
		SA	Composto
		0,20	Ceteareth-25

		0,50	Pantenol
		0,05	Benzofenona-4
		0,20	Amodimeticona, cloreto de cetrimônio, Trideceth-12
		15,00	Álcool
5	C	0,20	Hidroxietilcelulose
	D	6,00	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,00	Cloreto de cetrimônio
		QS	Perfume
10	B	63,85	Aqua dem.
		7,00	Poliquaternio-46
		SA	Composto
		0,20	Ceteareth-25
		0,50	Pantenol
15		0,05	Benzofenona-4
		0,20	Amodimeticona, cloreto de cetrimônio, Trideceth-12
		15,00	Álcool
	C	0,20	Hidroxietilcelulose
	D	6,00	Propano/butano
20	Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Adicionar a fase C e homogeneizar outra vez. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com fase D.		

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

25		%	Ingredientes (INCI)
	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		85,5	Aqua dem.
	B	7,0	Poliestireno sulfonato de sódio
30		SA	Composto
		0,5	Brometo de cetrimônio
		QS	Conservante

5	C	6,0	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		81,5	Aqua dem.
10	B	7,0	Poliestireno sulfonato de sódio
		SA	Composto
		0,5	Brometo de cetrimônio
		QS	Conservante
	C	6,0	Propano/butano

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

15		%	Ingredientes (INCI)
	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		92,0	Aqua dem.
	B	0,5	Poliquaternio-10
20		1,0	Composto
		0,5	Brometo de cetrimônio
		QS	Conservante
	C	6,0	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		88,0	Aqua dem.
25	B	0,5	Poliquaternio-10
		5,0	Composto
		0,5	Brometo de cetrimônio
		QS	Conservante
30	C	6,0	Propano/butano

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

5		%	Ingredientes (INCI)
	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		82,5	Aqua dem.
	B	10,0	Poliquaternio-16
10		SA	Composto
		0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
		QS.	Conservante
	C	6,0	Propano/butano
		%	Ingredientes (INCI)
15	A	QS	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		QS	Perfume
		78,5	Aqua dem.
	B	10,0	Poliquaternio-16
		SA	Composto
20		0,5	Fosfato de hidroxietil cetildimônio
		QS	Conservante
	C	6,0	Propano/butano

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

ESPUMAS MODELADORAS DO PENTEADO

		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
30	B	84,0	Aqua dem.
		2,0	Quitosana
		SA	Composto

		0,5	Copoliol dimeticona
		0,2	Ceteareth-25
		0,2	Pantenol
		0,1	PEG-25 PABA
5	C	10,0	HFC 152 A
		%	Ingredientes (INCI)
	A	2,0	Metossulfato de cocotrimônio
		QS	Perfume
	B	80,0	Aqua dem.
10		2,0	Quitosana
	SA		Composto
		0,5	Copoliol dimeticona
		0,2	Ceteareth-25
		0,2	Pantenol
15		0,1	PEG-25 PABA
	C	10,0	HFC 152 A

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Dissolver a fase B, agitar na fase A e homogeneizar. Ajustar o pH a 6-7. Encher um recipiente apropriado e carregar com a fase C.

20 XAMPUS

		%	Ingredientes (INCI)
	A	30,0	Laureth sulfato de sódio
		6,0	Cocoanfoacetato de sódio
		6,0	Betaína de cocamidopropila
25		3,0	Laureth sulfato de sódio, distearato glicol, cocamida MEA, Laureth-10
	SA		Composto
		7,7	Poliquaternio-44
		2,0	Amodimeticona
30		QS	Perfume
		QS	Conservante
		1,0	Cloreto de sódio

		43,3	Aqua dem.
	B	QS	Ácido cítrico
		%	Ingredientes (INCI)
	A	30,0	Laureth sulfato de sódio
5		6,0	Cocoanfoacetato de sódio
		6,0	Betaína de cocamidopropila
		3,0	Laureth sulfato de sódio, distearato glicol, cocamida MEA, Laureth-10
		SA	Composto
10		7,7	Poliquaternio-44
		2,0	Amodimeticona
		SA	Perfume
		SA.	Conservante
		1,0	Cloreto de sódio
15		39,3	Aqua dem.
	B	QS	Ácido cítrico

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Ajustar o pH a 6-7 com ácido cítrico.

GÉIS PARA CHUVEIRO

20		%	Ingredientes (INCI)
	A	40,0	Laureth sulfato de sódio
		5,0	Glucosídeo de decila
		5,0	Betaína de cocamidopropila
		SA	Composto
25		1,0	Pantenol
		QS	Perfume
		QS	Conservante
		2,0	Cloreto de sódio
		46,0	Aqua dem.
30	B	QS	Ácido cítrico
		%	Ingredientes (INCI)
	A	40,0	Laureth sulfato de sódio

	5,0	Glucosídeo de decila
	5,0	Betaína de cocamidopropila
	SA	Composto
	1,0	Pantenol
5	QS	Perfume
	QS	Conservante
	2,0	Cloreto de sódio
	42,0	Aqua dem.
	B	
	QS	Ácido cítrico

- 10 Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Ajustar o pH a 6-7 com ácido cítrico.

XAMPUS

	%	Ingredientes (INCI)
A	40,0	Laureth sulfato de sódio
15	5,0	Sulfonato de C12-15 Pareth-15 de sódio
	5,0	Glucosídeo de decila
	QS	Perfume
	0,1	Fitantriol
	44,6	Aqua dem.
20	SA	Composto
	0,3	Poliquaternio-10
	1,0	Pantenol
	QS	Conservante
	1,0	Laureth-3
25	2,0	Cloreto de sódio
	%	Ingredientes (INCI)
A	40,0	Laureth sulfato de sódio
	5,0	Sulfonato de C12-15 Pareth-15 de sódio
	5,0	Glucosídeo de decila
30	QS	Perfume
	0,1	Fitantriol
	40,6	Aqua dem.

	SA	Composto
	0,3	Poliquaternio-10
	1,0	Pantenol
	QS	Conservante
5	1,0	Laureth-3
	2,0	Cloreto de sódio

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Ajustar o pH a 6-7 com ácido cítrico.

XAMPUS

10	%	Ingredientes (INCI)
A	15,00	Betaína de cocamidopropila
	10,00	Cocoanfodiacetato dissódico
	5,00	Polissorbato 20
	5,00	Glucosídeo de decila
15	QS	Perfume
	QS	Conservante
	SA	Composto
	0,15	Cloreto de guar hidroxipropiltrimônio
	2,00	Laureth-3
20	58,00	Aqua dem.
	QS	Ácido cítrico
	B	3,00 Distearato de PEG-150
	%	Ingredientes (INCI)
	A	15,00 Betaína de cocamidopropila
25	10,00	Cocoanfodiacetato dissódico
	5,00	Polissorbato 20
	5,00	Glucosídeo de decila
	QS	Perfume
	QS	Conservante
30	SA	Composto
	0,15	Cloreto de hidroxipropiltrimônio guar
	2,00	Laureth-3

54,00 Aqua dem.

QS Ácido cítrico

B 3,00 Distearato de PEG-150

Produção: Pesar os compostos de fase A e misturar os mesmos. Ajustar o

5 pH a 6-7. Adicionar a fase B e aquecer até o máximo de 40°C.

LOÇÕES CORPORAIS

	%	Ingredientes (INCI)
10	A 2,0	Ceteareth-25
	2,0	Ceteareth-6, álcool estearílico
	3,0	Etilhexanoato de cetearila
	1,0	Dimeticona
	4,0	Álcool cetearílico
	3,0	Estearato de glicerila SE
	5,0	Óleo mineral
15	4,0	Óleo de semente (jojoba) Simmondsia Chinensis
	3,0	Óleo mineral, álcool lanolínico
	B 5,0	Propileno glicol
20	SA	Composto
	1,0	Pantenol
	0,5	Aluminossilicato de magnésio
	QS	Conservante
	65,5	Aqua dem.
	C QS	Perfume
25	D QS	Ácido cítrico
	%	Ingredientes (INCI)
30	A 2,0	Ceteareth-25
	2,0	Ceteareth-6, álcool estearílico
	3,0	Etilhexanoato de cetearila
	1,0	Dimeticona
	4,0	Álcool cetearílico
	3,0	Estearato de glicerila SE
	5,0	Óleo mineral

		4,0	Óleo de semente (jojoba) Simmondsia Chinensis
		3,0	Óleo mineral, álcool lanolínico
	B	5,0	Propileno glicol
	SA		Composto
5		1,0	Pantenol
		0,5	Alumino silicato de magnésio
	QS		Conservante
		61,5	Aqua dem.
	C	QS	Perfume
10	D	QS	Ácido cítrico

Produção: Aquecer as fases A e B separadamente a aproximadamente 40°C. Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Adicionar a fase C na fase A e B combinada e homogeneizar outra vez. Ajustar o pH com fase D a 6 - 7. Homogeneizar por agitação e resfriar em temperatura ambiente.

15 LOÇÕES CORPORAIS

		%	Ingredientes (INCI)
	A	6,0	PEG-7 óleo de rícino hidrogenado
		10,0	Etilhexanoato de cetearila
20		5,0	Miristato de isopropila
		7,0	Óleo mineral
		0,5	Manteiga de carité (Butyrospermum Parkii)
		0,5	Estearato de alumínio
		0,5	Estearato de magnésio
25		0,2	Bisabolol
		0,7	Quaternium-18-Hectorita
	B	5,0	Dipropileno glicol
		0,7	Sulfato de magnésio
	QS		Conservante
30		62,9	Aqua dem.
	C	QS.	Perfume
	SA		Composto

		%	Ingredientes (INCI)
5	A	6,0	PEG-7 óleo de rícino hidrogenado
		10,0	Etilhexanoato de cetearila
		5,0	Miristato de isopropila
		7,0	Óleo mineral
		0,5	Manteiga de carité (<i>Butyrospermum Parkii</i>)
		0,5	Estearato de alumínio
		0,5	Estearato de magnésio
		0,2	Bisabolol
10	B	0,7	Quaternium-18-Hectorita
		5,0	Dipropileno glicol
		0,7	Sulfato de magnésio
		QS	Conservante
15	C	58,9	Aqua dem.
		QS	Perfume
		SA	Composto

Produção: Aquecer as fases A e B separadamente a aproximadamente 80°C. Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Resfriar a 40°C e adicionar fase C. Homogeneizar outra vez e resfriar em temperatura ambiente.

CUIDADO DA PELE DIÁRIO O/A

		%	Ingredientes (INCI)
25	A	1,7	Ceteareth-6, álcool estearílico
		0,7	Ceteareth-25
		2,0	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
		2,0	PEG-14 Dimeticona
		3,6	Álcool cetearílico
		6,0	Metoxicinamato de etilhexila
		2,0	Adipato de dibutila
30	B	5,0	Glicerina
		0,2	EDTA dissódico
		1,0	Pantenol

		QS	Conservante
		67,8	Aqua dem.
	C	4,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico, copolímero acrilatos de sódio
	D	0,2	Fosfato de ascorbila de sódio
5		1,0	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol
		1,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico, ascorbato de sódio, tocoferol, retinol
		SA	Composto
10	E	QS	Hidróxido de sódio
		%	Ingredientes (INCI)
	A	1,7	Ceteareth-6, álcool estearílico
		0,7	Ceteareth-25
		2,0	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
15		2,0	PEG-14 Dimeticona
		3,6	Álcool cetearílico
		6,0	Metoxicinamato de etilhexila
		2,0	Adipato de dibutila
	B	5,0	Glicerina
20		0,2	EDTA dissódico
		1,0	Pantenol
		QS	Conservante
		63,8	Aqua dem.
	C	4,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico, copolímero acrilatos de sódio
25	D	0,2	Fosfato de ascorbila de sódio
		1,0	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol
		1,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico, ascorbato de sódio, tocoferol, retinol
30		SA	Composto
	E	QS	Hidróxido de sódio

Produção: Aquecer fase A e B separadamente a aproximadamente 80°C. Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Adicionar a fase C na fase A e B combinada e homogeneizar outra vez. Resfriar a aproximadamente 40°C e adicionar à fase D. Ajustar o pH com fase E a aproximadamente 6,5. Homogeneizar por agitação e resfriar em temperatura ambiente.

CREME O/A PROTETOR DA PELE PARA O DIA

		%	Ingredientes (INCI)
10	A	1,7	Ceteareth-6, álcool estearílico
		0,7	Ceteareth-25
		2,0	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
		2,0	PEG-14 Dimeticona
		3,6	Álcool cetearílico
		6,0	Metoxicinamato de etilhexila
		2,0	Adipato de dibutila
15	B	5,0	Glicerina
		0,2	EDTA dissódico
		1,0	Pantenol
		QS	Conservante
		68,6	Aqua dem.
20	C	4,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico, copolímero acrilatos de sódio
	D	1,0	Fosfato de ascorbila de sódio
		1,0	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol
		SA	Composto
25	E	QS	Hidróxido de sódio
		%	Ingredientes (INCI)
30	A	1,7	Ceteareth-6, álcool estearílico
		0,7	Ceteareth-25
		2,0	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
		2,0	PEG-14 dimeticona
		3,6	Álcool cetearílico
		6,0	Metoxicinamato de etilhexila

		2,0	Adipato de dibutila
	B	5,0	Glicerina
		0,2	EDTA dissódico
		1,0	Pantenol
5		QS	Conservante
		64,6	Aqua dem.
	C	4,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico, copolímero de acrilatos de sódio
	D	1,0	Ascorbil fosfato de sódio
10		1,0	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol
			Composto
	E	QS	Hidróxido de sódio

Produção: : Aquecer a fase A e B separadamente a aproximadamente 80°C.

- 15 Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Adicionar a fase C na fase A e B combinada e homogeneizar outra vez. Resfriar a aproximadamente 40°C e adicionar à fase D. Ajustar o pH com fase E a aproximadamente 6,5. Homogeneizar por agitação e resfriar em temperatura ambiente.

LIMPADOR FACIAL O/A

20		%	Ingredientes (INCI)
	A	10,0	Etilhexanoato de cetearila
		10,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico
		1,5	Ciclopentasiloxano, ciclohexasilosano
		2,0	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
25	B	3,5	Triglicerídeo caprílico/cáprico, copolímero de acrilatos de sódio
	C	1,0	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol
		QS	Conservante
30		QS	Perfume
	D	3,0	Poliquaternio-44
		0,5	Metossulfato de cocotrimônio

	0,5	Ceteareth-25
	2,0	Pantenol, propileno glicol
	4,0	Propileno glicol
	0,1	EDTA dissódico
5	SA	Composto
	60,7	Aqua dem.
	%	Ingredientes (INCI)
A	10,0	Etilhexanoato de cetearila
	10,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico
10	1,5	Ciclopentasiloxano, ciclohexassiloxano
	2,0	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
B	3,5	Triglicerídeo caprílico/cáprico, copolímero acrilatos de sódio
C	1,0	Acetato de tocoferila
15	0,2	Bisabolol
	QS	Conservante
	QS	Perfume
D	3,0	Poliquaternio-44
	0,5	Metossulfato de cocotrimônio
20	0,5	Ceteareth-25
	2,0	Pantenol, propileno glicol
	4,0	Propileno glicol
	0,1	EDTA dissódico
	SA	Composto
25	56,7	Aqua dem.

Produção: Dissolver a fase A e adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Adicionar a fase C na fase A e B combinada e homogeneizar outra vez. Adicionar a fase D na fase A, B e C combinada e homogeneizar outra vez. Dissolver a fase D e adicionar à fase A, B, e C e homogeneizar outra vez. Agitar durante 15 minutos.

PULVERIZAÇÃO CORPORAL DE CUIDADO DIÁRIO

	%	Ingredientes (INCI)
5	3,0	Metoxicinamato de etilhexila
	2,0	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
	1,0	Poliquaternio-44
	3,0	Propileno glicol
	2,0	Pantenol, propileno glicol
	1,0	Ciclopentasiloxano, ciclohexasiloxano
	10,0	Octildodecanol
10	0,5	PVP
	10,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico
	3,0	Benzoato de alquila C12-15
	3,0	Glicerina
	1,0	Acetato de tocoferila
15	0,3	Bisabolol
	SA	Composto
	59,2	Álcool
	%	Ingredientes (INCI)
20	3,0	Metoxicinamato de etilhexila
	2,0	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
	1,0	Poliquaternio-44
	3,0	Propileno glicol
	2,0	Pantenol, propileno glicol
	1,0	Ciclopentasiloxano, ciclohexasiloxano
	10,0	Octildodecanol
25	0,5	PVP
	10,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico
	3,0	Benzoato de alquila C12-15
	3,0	Glicerina
	1,0	Acetato de tocoferila
30	0,3	Bisabolol
	SA	Composto

55,2 Álcool

Produção: Pesar todos os ingredientes da fase A e dissolver completamente por agitação.

GEL DE CUIDADO DA PELE

5		%	Ingredientes (INCI)
	A	3,6	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		15,0	Álcool
		0,1	Bisabolol
		0,5	Acetato de tocoferila
10		QS	Perfume
	B	3,0	Pantenol
		0,6	Carbômero

SA Composto

		75,4	Aqua dem,
15	C	0,8	Trietanolamina
		%	Ingredientes (INCI)
	A	3,6	PEG-40 óleo de rícino hidrogenado
		15,0	Álcool
		0,1	Bisabolol
20		0,5	Acetato de tocoferila
		QS	Perfume
	B	3,0	Pantenol
		0,6	Carbômero
		SA	Composto
25		71,4	Aqua dem,
	C	0,8	Trietanolamina

Produção: Dissolver a fase A. Intumescer a fase B e neutralizar com a fase C. Adicionar fase A à fase B e C e homogeneizar por agitação.

LOÇÕES PÓS-BARBA

30		%	Ingredientes (INCI)
	A	10,0	Etilhexanoato de cetearila
		5,0	Acetato de tocoferila

		1,0	Bisabolol
		0,1	Perfume
		0,3	Polímero cruzado/ acrilatos C10-30 acrilato de alquila
	B	15,0	Álcool
5		1,0	Pantenol
		3,0	Glicerina
		SA	Composto
		1,0	Trietanolamina
		63,5	Aqua dem.
10		%	Ingredientes (INCI)
	A	10,0	Etilhexanoato de cetearila
		5,0	Acetato de tocoferila
		1,0	Bisabolol
		0,1	Perfume
15		0,3	Polímero cruzado de acrilatos /C10-30 acrilato de alquila
	B	15,0	Álcool
		1,0	Pantenol
		3,0	Glicerina
		SA	Composto
20		0,1	Trietanolamina
		59,5	Aqua dem.

Produção: Dissolver a fase A. Dissolver a fase B e adicionar à fase A. Homogeneizar por agitação.

LOÇÕES PÓS- SOL

25		%	Ingredientes (INCI)
	A	0,4	Polímero cruzado de acrilatos /C10-30 acrilato de alquila
		15,0	Etilhexanoato de cetearila
		0,2	Bisabolol
		1,0	Acetato de tocoferila
30		QS.	Perfume
	B	1,0	Pantenol
		15,0	Álcool

		3,0	Glicerina
		SA	Composto
		63,2	Aqua dem,
	C	0,2	Trietanolamina
5		%	Ingredientes (INCI)
	A	0,4	Polímero cruzado de acrilatos /C10-30 acrilato de alquila
		15,0	Etilhexanoato de cetearila
		0,2	Bisabolol
		1,0	Acetato de tocoferila
10		QS	Perfume
	B	1,0	Pantenol
		15,0	Álcool
		3,0	Glicerina
		SA	Composto
15		59,2	Aqua dem,
	C	0,2	Trietanolamina

Produção: Dissolver a fase A. Dissolver a fase B e adicionar à fase A. Homogeneizar por agitação. Neutralizar a fase A e B por adicionar a fase C e homogeneizar outra vez.

20 LOÇÕES DE FILTRO SOLAR

		%	Ingredientes (INCI)
	A	4,5	Metoxicinamato de etilhexila
		2,0	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
		3,0	Octocrileno
25		2,5	Malato de Di-C12-13 alquila
		0,5	Acetato de tocoferila
		4,0	Distearato de poligliceril-3 metil glicose
	B	3,5	Isononanoato de cetearila
		1,0	Copolímero de VP/eicoseno
30		5,0	Isohexadecano
		2,5	Malato de Di-C12-13 alquila
		3,0	Dióxido de titânio, trimetoxicaprililsilano

	C	5,0	Glicerina
		1,0	Cetearil sulfato de sódio
		0,5	Goma de xantano
		59,7	Aqua dem.
5	D	SA	Composto
		1,0	Fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, butilparabeno, propilparabeno, isobutilparabeno
		0,3	Bisabolol
		%	Ingredientes (INCI)
10	A	4,5	Metoxicinamato de etilhexila
		2,0	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
		3,0	Octocrileno
		2,5	Malato de Di-C12-13 alquila
		0,5	Acetato de tocoferila
15		4,0	Distearato de poligliceril-3 metil glicose
	B	3,5	Isononanoato de cetearila
		1,0	Copolímero de VP/eicoseno
		5,0	Isohexadecano
		2,5	Malato de alquila Di-C12-13
20		3,0	Dióxido de titânio, trimetoxicaprililsilano
	C	5,0	Glicerina
		1,0	Cetearil sulfato de sódio
		0,5	Goma de xantano
		55,7	Aqua dem.
25	D	SA	Composto
		1,0	Fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, butilparabeno, propilparabeno, isobutilparabeno
		0,3	Bisabolol

Produção: Aquecer fase A e B separadamente a aproximadamente 80°C.

- 30 Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Aquecer a fase C a 80°C e adicionar na fase A e B combinada e homogeneizar outra vez. Resfriar a aproximadamente 40°C e adicionar à fase D. Homogeneizar outra vez.

LOÇÕES DE FILTRO SOLAR O/A

		%	Ingredientes (INCI)
5	A	2,0	Ceteareth-6, álcool estearílico
		2,0	Ceteareth-25
		3,0	Tribehenin
		2,0	Álcool cetearílico
		2,0	Etilhexanoato de cetearila
		5,0	Metoxicinamato de etilhexila
		1,0	Etilhexil triazona
10		1,0	Copolímero de VP/eicoseno
		7,0	Miristato de isopropila
	B	5,0	Óxido de zinco, trietoxicaprililsilano
	C	0,2	Goma de xantano
15		0,5	Acrilato de hidroxietila/copolímero de taurato acriloldi-
		metila de sódio, esqualeno, polissorbato 60	
	0,2	EDTA dissódico	
	5,0	Propileno glicol	
	0,5	Pantenol	
		60,9	Aqua dem.
20	D	SA	Composto
		0,5	Fenoxietanol, metilparabeno, butilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, isopropilparabeno
		1,0	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol
		25	
	A	2,0	Ceteareth-6, álcool estearílico
2,0		Ceteareth-25	
3,0		Tribehenin	
2,0		Álcool cetearílico	
30		2,0	Etilhexanoato de cetearila
		5,0	Metoxicinamato de etilhexila
		1,0	Etilhexil triazona

		1,0	Copolímero de VP/eicoseno
		7,0	Miristato de isopropila
	B	5,0	Óxido de zinco, trietoxicaprililsilano
	C	0,2	Goma de xantano
5		0,5	Copolímero acrilato de hidroxietila/taurato de acriloldimetila de sódio, esqualeno, polissorbato 60
		0,2	EDTA dissódico
		5,0	Propileno glicol
		0,5	Pantenol
10		56,9	Aqua dem.
	D	SA	Composto
		0,5	Fenoxietanol, metilparabeno, butilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, isopropilparabeno
		1,0	Acetato de tocoferila
15		0,2	Bisabolol

Produção: Aquecer fase A e B separadamente a aproximadamente 80°C. Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Aquecer a fase C a 80°C e adicionar na fase A e B combinada e homogeneizar outra vez. Resfriar a aproximadamente 40°C e adicionar à fase D. Homogeneizar outra vez.

20 LOÇÕES DE FILTRO SOLAR O/A

		%	Ingredientes (INCI)
	A	3,5	Ceteareth-6, álcool estearílico
		1,5	Ceteareth-25
		7,5	Metoxicinamato de etilhexila
25		2,0	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
		2,0	Ciclopentasiloxano, ciclohexasiloxano
		0,5	Cera de abelhas
		3,0	Álcool cetearílico
		10,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico
30	B	5,0	Dióxido de titânio, sílica, meticona, alumina
	C	3,0	Glicerina
		0,2	EDTA dissódico

		0,3	Goma de xantano
		1,0	Glucosídeo de decila
		2,0	Pantenol, propileno glicol
		56,3	Aqua dem.
5	D	SA	Composto
		1,0	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol
		QS	Perfume
		QS	Conservante
10		%	Ingredientes (INCI)
	A	3,5	Ceteareth-6, álcool estearílico
		1,5	Ceteareth-25
		7,5	Metoxicinamato de etilhexila
		2,0	Benzoato de dietilamino hidroxibenzoil hexila
15		2,0	Ciclopentasiloxano, ciclohexasiloxano
		0,5	Cera de abelhas
		3,0	Álcool cetearílico
		10,0	Triglicerídeo caprílico/cáprico
	B	5,0	Dióxido de titânio, sílica, meticona, alumina
20	C	3,0	Glicerina
		0,2	EDTA dissódico
		0,3	Goma de xantano
		1,0	Glucosídeo de decila
		2,0	Pantenol, propileno glicol
25		52,3	Aqua dem.
	D	SA	Composto
		1,0	Acetato de tocoferila
		0,2	Bisabolol
		QS	Perfume
30		QS	Conservante

Produção: Aquecer fase A e B separadamente a aproximadamente 80°C. Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Aquecer a fase C a

80°C e adicionar na fase A e B combinada e homogeneizar outra vez. Resfriar a aproximadamente 40°C e adicionar à fase D. Homogeneizar outra vez.

BÁLSAMO PARA OS PÉS

		%	Ingredientes (INCI)
5	A	2,0	Ceteareth-6, álcool estearílico
		2,0	Ceteareth-25
		5,0	Etilhexanoato de cetearila
		4,0	Álcool cetílico
		4,0	Estearato de glicerila
10		5,0	Óleo mineral
		0,2	Mentol
		0,5	Cânfora
	B	69,3	Aqua dem.
		QS	Conservante
15	C	1,0	Bisabolol
		1,0	Acetato de tocoferila
	D	SA	Composto
		5,0	Extrato de hamamélia
		%	Ingredientes (INCI)
20	A	2,0	Ceteareth-6, álcool estearílico
		2,0	Ceteareth-25
		5,0	Etilhexanoato de cetearila
		4,0	Álcool cetílico
		4,0	Estearato de glicerila
25		5,0	Óleo mineral
		0,2	Mentol
		0,5	Cânfora
	B	65,3	Aqua dem.
		QS	Conservante
30	C	1,0	Bisabolol
		1,0	Acetato de tocoferila
	D	SA	Composto

5,0 Extrato de hamamélia

Produção: Aquecer fase A e B separadamente a aproximadamente 80°C. Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Resfriar a aproximadamente 40°C e adicionar fase C e D. Homogeneizar por agitação e resfriar em temperatura ambiente.

A/O

		%	Ingredientes (INCI)
10	A	6,0	PEG-7 óleo de rícino hidrogenado
		8,0	Etilhexanoato de cetearila
		5,0	Miristato de isopropila
		15,0	Óleo mineral
		0,3	Estearato de magnésio
		0,3	Estearato de alumínio
		2,0	PEG-45/copolímero dodecil glicol
15	B	5,0	Glicerina
		0,7	Sulfato de magnésio
		55,6	Aqua dem.
20	C	1,0	Composto
		0,5	Acetato de tocoferila
		0,6	Bisabolol
25	A	%	Ingredientes (INCI)
		6,0	PEG-7 óleo de rícino hidrogenado
		8,0	Etilhexanoato de cetearila
		5,0	Miristato de isopropila
		15,0	Óleo mineral
		0,3	Estearato de magnésio
		0,3	Estearato de alumínio
30	B	2,0	PEG-45/copolímero dodecil glicol
		5,0	Glicerina
		0,7	Sulfato de magnésio
		51,6	Aqua dem.
		5,0	Composto
	C		

0,5 Acetato de tocoferila

Produção: Aquecer fase A e B separadamente a aproximadamente 85°C.

Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Resfriar a aproximadamente 40°C e adicionar fase C. Homogeneizar por agitação e resfriar

5 em temperatura ambiente.

MAQUIAGEM LÍQUIDA - TIPO O/A

		%	Ingredientes (INCI)
10	A	2,0	Ceteareth-6, álcool estearílico
		2,0	Ceteareth-25
		6,0	Estearato de glicerila
		1,0	Álcool cetílico
		8,0	Óleo mineral
		7,0	Etilhexanoato de cetearila
		0,2	Dimeticona
15	B	3,0	Propileno glicol
		1,0	Pantenol
		QS	Conservante
		61,9	Aqua dem.
20	C	0,1	Bisabolol
		SA	Composto
		QS	Perfume
	D	5,7	C. I. 77 891, dióxido de titânio
		1,1	Óxidos de ferro
		%	Ingredientes (INCI)
25	A	2,0	Ceteareth-6, álcool estearílico
		2,0	Ceteareth-25
		6,0	Estearato de glicerila
		1,0	Álcool cetílico
		8,0	Óleo mineral
30		7,0	Etilhexanoato de cetearila
		0,2	Dimeticona
	B	3,0	Propileno glicol

	1,0	Pantenol
	QS	Conservante
	57,9	Aqua dem.
C	0,1	Bisabolol
5	SA	Composto
	QS	Perfume
D	5,7	C. I. 77 891, dióxido de titânio
	1,1	Óxidos de ferro

Produção: Aquecer fase A e B separadamente a aproximadamente 80°C.

- 10 Adicionar fase B à fase A e homogeneizar por agitação. Resfriar a 40°C e adicionar à fase C e D. Homogeneizar outra vez e resfriar em temperatura ambiente.

BASE

	<u>Ingrediente</u>	<u>Nome INCI</u>	<u>%</u>
15	<u>Fase em água</u>		
	Dow Corning 9011	Ciclopentasiloxano, PEG-12 Dimeticona	
	Mistura de elastômero	Copolímero	15,00
	Dow Corning 245 Fluid	Ciclopentasiloxano	5,00
	Silcare 31 M50 SV	Caprilil Trimeticona	6,35
20	Propilparabeno		0,05
	AS 5811	Dióxido de titânio, trietoxicaprililsilano	7,50
	AS 5131	Óxidos de ferro, trietoxicaprililsilano	0,70
	AS 5146	Óxidos de ferro, trietoxicaprililsilano	0,05
	AS 5126	Óxidos de ferro, trietoxicaprililsilano	0,35
25	AS 50230	Talco, trietoxicaprililsilano	3,50
	<u>Fase em óleo</u>		
	Água deionizada		53,30
	1,80 Butileno glicol		6,00
	Metilparabeno		0,20
30	Ácido benzóico		
	Composto		SA

Os pigmentos (AS 5811, 5131, 5146, 5126, e 50230; Color Te-

5

15

Os ingredientes de ambos um controle de preparação como de um rímel contendo 2% são como a seguir:

202530

<u>Fase # Fase Cera</u>			
	8 Arlacel 165	1,00	1,00
	8 Cerasynt SD Estearato de glicerila (ISP)	3,50	3,50
	8 Cera de abelha, White SP 424 Cera de abelha (S&P)		
5		7,50	7,50
	8 Carnauba #1 Copernica Cerifera (Carnauba) Wax (S&P)	4,80	4,80
	8 Propilparabeno	0,10	0,10
	9 Água deionizada	20,00	-
10	9 10% Composto/Água	-	20,00
	10 Água deionizada	1,00	1,00
	10 Agente deslizante Hidantoína DMDM (Lonza)		
		<u>0,36</u>	<u>0,36</u>
		100,00	100,00

- 15 Para produzir a formulação de rímel, a fase de cera 8 é combinada e aquecida a 85-90 °C com misturação de propulsor. A solução de composto a 10% é preparada por adição de composto A a água enquanto misturando com propulsor. A água da fase 1 é adicionada a um béquer com tara de aço inoxidável (aproximadamente 50 g de excesso são adicionados
- 20 para compensar perdas). O metilparabeno de fase 2 é adicionado a butileno glicol e agitado enquanto aquecendo no topo de um banho de vapor até dissolver, então adicionado a água com agitação de homomisturador lento. Então, a fase 4 de óxido de ferro preto é adicionada, enquanto mantendo a agitação. Então, Natrosol é aspergido, enquanto mantendo a agitação. O KOH
- 25 a 10% é adicionado e o aquecimento começa a 85 °C, com o béquer coberto tão firmemente quanto possível. Quando o Natrosol está dissolvido, o ácido cítrico a 10% é adicionado em gotas, mantendo temperatura e agitação. Então o Arlacel 165 é adicionado lentamente e misturado durante pelo menos 5 min para assegurar dissolução. A 85-90 °C, a fase cera é lentamente adicionada à fase de água enquanto homomisturando. A temperatura e agitação
- 30 são mantidas durante 10 min. A batelada é removida do banho de vapor e deixada resfriar enquanto homo-misturando com raspagem manual ocasio-

nal das paredes do béquer. A 55 °C, a batelada é pesada para verificar a perda de peso. A misturação é iniciada e a água é adicionada, se necessário. A 45 °C, as fases 9 e 10 são adicionadas. O resfriamento é continuado usando água fria a 30 °C. Neste ponto, a raspagem manual contínua das

5 paredes do béquer é necessária.

Nesta preparação, a quantidade pequena de KOH (na fase 5) é usada para elevar o pH para dispersar o Natrosol que é revestido com glio-
xal para retardar a umectação, e evitar aglomeração. Na fase 7, o ácido cítri-
co é adicionado lentamente para ajustar o pH a ~5,5, abaixo do ponto isoele-
trico dos óxidos de ferro. Nas fases 7 e 8, o Arlacel 165 é dividido entre as

10 fases óleo e água, como a emulsificação é mais fácil de obter com o tensoa-
tivo em ambas as fases. Na fase 9, a água deionizada é adicionada à bate-
lada de controle em vez de composto. A solução de composto é preparada
enquanto a emulsão está sendo processado, de modo a ser absolutamente

15 fresca. Esta preparação provê uma formulação apropriada para uso como
um rímel.

EXEMPLO 2

Estudos de clareamento da pele

Neste exemplo, as experiências conduzidas para avaliar as ca-
pacidade de clareamento da pele de BBI-AV são descritas. Treze indivíduos,

20 com idades de 18-65, com tipos de pele Fitzpatrick III ou IV participaram
deste estudo de 22 dias. A classificação de pele de Fitzpatrick é baseada na
resposta não protegida da pele aos primeiros 30 a 45 minutos de exposição
ao sol após uma estação no inverno sem exposição ao sol. As categorias de

25 tipos de pele são:

- I - sempre queima facilmente; nunca se bronzeia
- II - sempre queima facilmente; bronzeia minimamente
- III - queima moderadamente; bronzeia gradualmente
- IV - queima minimamente; sempre bronzeia bem
- 30 V - raramente queima; bronzeia profusamente
- VI - nunca queima; profundamente pigmentado

Cinco sítios de teste de cor uniforme foram marcados no dorso

inferior de cada indivíduo. O classificador clínico avaliou o grau de bronzeado em cada sítio usando uma escala 0 - 10 (0 = bronzeado muito leve e 10 = bronzeado muito profundo). Cada indivíduo foi pré-tratado com uma concentração de molécula A, duas concentrações de molécula B, tampão de controle de veículo, e um sítio não tratado durante 11 dias consecutivos. Aproximadamente 150 uL de materiais de teste (0,1% e 0,9% de BBI-AV) e controle de veículo foram dosados no dorso inferior usando adesivos oclusivos. Os adesivos oclusivos consistiam em um chumaço Webril® (pano não tecido) mantido na pele com uma fita porosa, hipoalergênica (por exemplo, SCAN-PORE® ou MICROPORE®). Uma tira de fita BLENDERM® igual na largura do chumaço de algodão cobriu o lado de fora da fita de modo a prover um adesivo oclusivo. Os adesivos permaneceram no local até o clínico remover no dia seguinte. Este procedimento foi repetido durante 11 dias.

No dia 12, o clínico removeu os adesivos que foram aplicados no dia anterior e o sítio foi suavemente limpo para remover o material de teste residual. O classificador clínico avaliou o grau de bronzeado em cada sítio usando uma escala de 0-11 (0 = sem bronzeado e 11 = bronzeado muito profundo). Os resultados são dados na tabela abaixo. Como indicado, não se tem uma maior mudança na classificação de bronzeado com o BBI-AV do que o controle de veículo.

Material de teste	Dia 1 Grau de bronzeamento médio	Dia 11 Grau de bronzeamento médio	Mudança no grau de bronzeamento médio
Controle de veículo	4,92	4,82	-0,1
0,9% BBI-AV	4,96	4,69	-0,27

EXEMPLO 3

Redução em pigmentação de pele

Neste exemplo, as experiências conduzidas para testar a capacidade de BBI-AV de reduzir a pigmentação da pele induzida por exposição a Uva são descritas. Este estudo foi conduzido com 13 indivíduos de tipo de pele III e IV com base na classificação de pele de Fitzpatrick.

No dia um, cada dose de escurecimento com pigmento persis-

tente mínima do indivíduo (MPPD) foi determinada no dorso inferior de cada indivíduo, em uma área que é igual em cor à área que recebeu a aplicação de material de teste. Os indivíduos receberam cinco a sete exposições de UVA, com cada exposição representando um aumento de cerca de 25% sobre a exposição anterior. Os indivíduos retornaram à clínica 3 - 4 horas após as exposições de MPPD estarem completas. Os sítios de teste foram classificados para escurecimento por pigmento usando a seguinte escala:

- sem escurecimento de pigmento visível
 - ? resposta questionável, indistinto
 - + leve escurecimento sobre essencialmente o campo de irradiação completo
 - ++ escurecimento definido sobre o campo de irradiação completo
- O sítio tratado com a dose menor de Uva produzindo um escore de "+" representou este MPPD do indivíduo.

- No dia dois, sítios de cor uniforme foram marcados no dorso inferior. O classificador clínico avaliou o grau de bronzeado em cada sítio usando uma escala 0 - 10 (0 = bronzeado muito leve e 10 = bronzeado muito profundo). Então o material de teste (0,1% e 0,9% de BBI-AV) e o controle de veículo aplicados sob oclusão. Um volume de 150 µl foi dosado sobre cada adesivo. Os adesivos oclusivos usados nestas experiências foram iguais que descritos no exemplo 2. Como descrito no exemplo 2, os curativos permaneceram no local até o próximo dia, quando um clínico os removeu. O procedimento foi repetido durante 11 dias. Nos dias 12 - 14, o clínico removeu os adesivos que foram aplicados no dia anterior e o sítio foi suavemente limpo para remover material de teste residual. O classificador clínico avaliou o grau de bronzeado em cada sítio usando uma escala de 0-11 (0 - sem bronzeado e 11 - bronzeado muito profundo). Após completar a classificação, cada sítio foi exposto a 1,0 MPPD de UVA, como descrito para dia 1. Novos curativos foram aplicados após as exposições estarem completas. No dia 15, os curativos foram removidos e o grau de bronzeado de cada sítio foi avaliado usando uma escala 0-10 (0 = sem bronzeado e 10 = bronzeado muito profundo). Os resultados são dados abaixo.

Tratamento	Dia 12 Grau de bronzeamento médio	Dia 13 Grau de bronzeamento médio	Dia 14 Grau de bronzeamento médio	Dia 15 Grau de bronzeamento médio
Tampão	4,82	5,29	5,59	5,98
0,1% BBI-AV	4,76	5,08	5,13	5,5
0,9% BBI-AV	4,69	4,92	5,04	5,5

Os resultados mostraram que a pigmentação induzida por UVA é diminuída no caso de sítios expostos a BBI-AV. Isto é ainda evidente quando o aumento no grau de bronzeamento é tabulado na tabela abaixo. Na tabela, os resultados do grau de bronzeamento são mostrados como os resultados obtidos para dia 12 subtraído dos graus dos dias 13, 14 e 15.

Tratamento	Mudança dia 13	Mudança dia 14	Mudança dia 15
Tampão	0,41	0,77	1,16
0,1% BBI-AV	0,32	0,37	0,74
0,9% BBI-AV	0,23	0,35	0,81

EXEMPLO 4

Inibição do crescimento de cabelo

Neste Exemplo, experimentos para determinar a capacidade das composições da presente invenção de inibir o crescimento de pêlo são descritos. Em particular, estes experimentos são conduzidos a fim de avaliar a capacidade das composições da presente invenção de diminuir o crescimento de pêlo após a depilação por barbear ou uso de cremes ou ceras.

Experiências com pêlos faciais

Nestas experiências, um grupo (por exemplo, 5) indivíduos do sexo masculino com classificação de pele Fitzpatrick II foram testados. Os indivíduos são solicitados a não usar tratamento facial tópico antes do começo das experiências. No dia 1, o crescimento do pêlo facial é visualmente avaliado e fotografado. Após esta avaliação e fotografia, a(s) composição (ões) a serem testadas, assim como o controle de veículo são aplicados na(s) concentração(ões) desejada(s). Começando no dia 2, os indivíduos aplicam a(s) composição (ões) imediatamente após barbear. Nenhum outro

tratamento pré- ou pós-barbear é usado durante as experiências. Na maioria dos casos, a experiência continua durante um período de tempo de 30 a 45 dias. O crescimento do pêlo facial é visualmente avaliado e fotografado a cada três dias durante as experiências. O número de pêlos, assim como a
 5 extensão do eixo do pêlo e que são medidos usando análise de imagem computadorizada. Em modalidades preferidas, se nota uma diminuição no número de pêlos, espessura do pêlo e/ou comprimento do pêlo devido à aplicação do(s) composto(s) de teste).

Experiências com pêlos nas pernas

10 Nestas experiências, um grupo (por exemplo 5) de indivíduos do sexo feminino com classificação de pele Fitzpatrick II foram testados. Os indivíduos são solicitados a não usar tratamento tópico nas pernas antes do começo das experiências. No dia 1, as áreas em ambas as pernas de cada indivíduo são marcadas e o crescimento dos pêlos é visualmente avaliado e
 15 fotografado. Após esta avaliação e fotografia, a(s) composição (ões) a serem testadas são aplicadas na(s) concentração(ões) desejada(s). Após esta avaliação e fotografia, a (s) composição (ões) a serem testadas (isto é, os compostos de teste contendo uma concentração desejada de BBI-AV), assim como um controle de veículo, são aplicados na(s) concentração(ões) dese-
 20 jada(s). Em alguns métodos, cada indivíduo é provido com dois tubos, um dos quais contém o BBI-AV e o outro contendo o controle de veículo. Estes tubos são marcados "esquerdo" e "direito". Cada dia durante as experiências, o indivíduo aplica as composições nos dois tubos nas pernas respectivas. Após 7 dias de aplicação, os indivíduos são visualmente avaliados e
 25 fotografados. Ambas as pernas são então raspadas ou expostas a um depilatório e os indivíduos de teste continuam a aplicar as composições como antes. O crescimento de pêlos é então avaliado visualmente e por fotografia de áreas apropriadas nas pernas a cada 2 dias. Após 10 dias, as pernas são novamente raspadas e os indivíduos de teste continuam a aplicar as compo-
 30 sições como antes. Em alguns métodos, as experiências são conduzidas durante 3 ciclos e o crescimento de pêlos é visualmente avaliado e as fotografias tomadas. As experiências são então continuadas por mais 8 dias. Em

modalidades preferidas, se nota uma diminuição no número de pêlos, espessura do pêlo e/ou comprimento do pêlo devido à aplicação do(s) composto(s) de teste) na(s) área(s) marcada(s).

5 Começando no dia 2, os indivíduos aplicam a(s) composição (ões) imediatamente após raspar. Não é usado nenhum outro tratamento pré- ou pós-raspagem durante as experiências. Na maioria dos casos, a experiência continua durante um tempo de 30 a 45 dias. O crescimento de pêlos é visualmente avaliado e fotografado a cada três dias durante as experiências. O número de pêlos, assim como a extensão do eixo do pêlo e que
10 são medidos usando análise de imagem computadorizada. Em modalidades preferidas, se nota uma diminuição no número de pêlos, espessura do pêlo e/ou comprimento do pêlo devido à aplicação do(s) composto(s) de teste).

EXEMPLO 5

15 "Panning", de uma biblioteca de peptídeos com apresentação na superfície de fagos

Neste Exemplo, foram descritos experimentos conduzidos para triar uma biblioteca com apresentação de fagos. Uma biblioteca de peptídeos com apresentação de fagos comercialmente disponível PhD C7C (NEB) foi triada contra hVEGF₁₆₅ (R&D systems) por 3 ciclos de acordo com
20 as instruções dos fabricantes. Este procedimento forneceu os perfis de sequência resumidos na figura 1. Os clones individuais foram confirmados usando ELISA de fagos de acordo com as instruções dos fabricantes (vide, figura 2).

EXEMPLO 6

25 Análise de ligação de BIAcore® de peptídeos de ligação VEGF

Neste Exemplo, experimentos conduzidos para avaliar as afinidades dos peptídeos para VEGF são descritos. As afinidades dos peptídeos para VEGF foram medidos usando um sistema de ressonância de plasmon de superfície BIAcore® 3000 (Biacore). Um chip sensor A CM5 foi condicionado com 50 mM NaOH, 0,1% HCl, 0,1% SDS, e 0,08% H₃PO₄, e ativados
30 para copulação covalente de VEGF usando cloridrato de *N*-etil -*N*-(3-dimetil aminopropil)-carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo

com as instruções dos fabricantes (Biacore). VEGF₁₆₅ humano (Biosource) foi diluído a 5 µg/ml em 20 mM acetato de sódio, pH 4,8 e injetado a uma taxa de fluxo de 2 µl/min para obter aproximadamente 1000 a 6000 unidades de resposta (RU) de proteína copulada. TNF-alfa (TNF-alfa humano, Biosource, Int., Camarillo, CA) foi similarmente copulado no chip sensor CM5 em aproximadamente 850 a 3500 RU na trilha de referência. Uma solução de 1 M etanolamina foi injetada como um agente de bloqueio. Em algumas experiências, uma solução adicional de EDC e NHS foi injetada para melhorar a estabilidade da linha de base e uma solução de 1 M etanolamina injetada como um agente de bloqueio. A trilha de referência foi ativada com EDC e NHS e bloqueada com etanolamina.

Os peptídeos foram sintetizados usando química FMO padrão, purificados por HPLC de fase reversa a > 95% de pureza (SynPep), e armazenados a 10 mg/mL em DMSO. Para medidas cinéticas, peptídeos diluídos em série de duas vezes em tampão HBS-EP, 0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% Surfactant P20 (Biacore), foram injetados a 25°C a uma taxa de fluxo de 20 µL/min. Amostras de DMSO diluídas em série de duas vezes e amostras de tampão foram também injetadas para subtração de fundo. Os parâmetros cinéticos foram calculados usando software BIAevaluation 3,1. Resultado destes experimentos são apresentados na Figura 3.

EXEMPLO 7

Constructo de suportes "scaffold" de peptídeo-BLA

Neste Exemplo, são descritos métodos usados na constructo de constructos anti-VEGF-BBI. Plasmídeo pCM01 (5,1 kb) codifica uma sequência de peptídeo de 15 aminoácidos CK37281 fundida no N-término de β-lactamase de *Enterobacter cloacae* (BLA) com uma sequência de sinal pIII e etiqueta C-terminal 6XHis, (vide, Figura 4). O plasmídeo também transporta um gene de resistência a cloranfenicol (CAT) como um marcador selecionável e expressão é dirigida por um promotor *lac* (Plac). Plasmídeo pCM01 foi construído usando um vetor Bbs1, pME30 construído a partir de pCB04. pCB04 foi digerido com *DraIII* e *Spe I* (NEB), resultando em fragmentos de 2,8 kb e 2,1kb. Para fazer os insertos, os pares oligo NtermStf2-F

e NtermStf2-R (5 μ M) foram combinados em um volume total de 50 μ l em água, a mistura foi aquecida a 95°C em bloco de calor durante 5 minutos, e o bloco foi deixado resfriar em temperatura ambiente.

Oligos: NtermStf2-F e NtermStf2-R para inserto de vetor "stuffer"

5 NtermStf2-F

5'[Phos]

CTAGTGTCTTCGATCAAGTCGACAACAGCCTGTCTGCAGATCCTGAAGA
CTGGCGGAGGTGGTCGCGAATACGATTACCCCGCTGATGAAAGCACAG
A 3' (SEQ ID NO:26)

10 NtermStf2-R

5'[Phos]

GTGCTTTCATCAGCGGGGTAATCGTATTCGCGACCACCTCCGCCAGTCT
TCAGGATCTGCAGACAGGCTGTTGTGCGACTTGATCGAAGACA 3' (SEQ
ID NO:27)

15 O fragmento de 2,8kb, o fragmento de 2,1kb, e inserto *stuffer* (100bp) foram ligados durante a noite a 16°C em uma relação molar de 1:1:5 respectivamente, usando 10 μ l de DNA mix e 10 μ l de solução Takara I liga-se. Ligações foram purificadas usando kit DNA "clean" de Zymo Research e eluídas em 2x 8 μ l de água. Então, 5 μ l de mistura de ligação foram trans-
20 formados em 50 μ l células electrocompetentes Top 10 (Invitrogen), 250 μ l SOC foram adicionados e as células cultivadas durante 1 hora a 37°C. A mistura de transformação foi diluída 1/10 e colocada em placas em ambas as placas LA + 5 ppm CMP e LA + 5 ppm CMP + 0,1 ppm CTX, seguido por incubação durante a noite a 37°C. 12 colônias foram retiradas das placas
25 CMP, cultivadas em LB + 5 ppm CMP, DNA foi isolado e digerido com enzima *BbsI* (2 sítios em plasmídeo *stuffer*). pCB04 (WT) foi também digerido como controle. Um clone tinha a sequência correta e foi designado pME22.

O plasmídeo de expressão peptídeo VEGF -BLA pCM01 foi construído a partir de pME22 usando os seguintes iniciadores para o inserto
30 BBs1 (vide, Figura 5); Oligos VegF-F, VegF-5R, VegF-3RP para inserto de peptídeo.

VegF-F

5'ACTAGTCGTTTCCTTTCTATTCTCACTCTGCTTGTACCCTGTGGCCGAC
CTTCTGGTGCGGTGGAGGTTTCGACGCCAGTGTCAGAAAAACAGCTG 3'
(SEQ ID NO:28)

5 VegF-5R

5' AGCAGAGTGAGAATAGAAAGGAACGAC 3' (SEQ ID NO:29)

VegF-3RP

5' [Phos]CCGCCAGCTGTTTTTCTGACACTGG 3' (SEQ ID NO:30)

As proteínas de fusão BLA-peptídeo pCM01 e pCB04 (WT) e
10 uma biblioteca de tendências pCM04 foram expressados em *E. coli* (TOP10;
Invitrogen) em frascos de agitação de 1-L na presença de 5 ppm CMP e 0,1
ppm antibiótico cefotoxima a 25°C durante 40 horas. As pastas de células
foram coletadas das culturas de células de 200 ml por centrifugação a
3,000xg durante 10 min. As pastas foram então tratadas com 25 ml de rea-
15 gente B-PER (Pierce) durante 40 min com mistura lenta. O extrato foi sepa-
rado por centrifugação a 20,000xg durante 20 min. A atividade BLA atividade
de todas as frações líquidas foi testada usando nitrocefina e a concentração
de proteínas de fusão em cada fração foi calculada considerando a mesma
atividade específica como a enzima WT. As proteínas de fusão foram purifi-
20 cadas por cromatografia IMAC. As frações ativas BLA eluídas com imidazol
foram reunidas e a pureza foi verificada como sendo melhor do que 95%
como verificado por SDS-PAGE (vide, Figura 6).

EXEMPLO 8Triagem de uma bibliotecas de esqueleto de Peptídeo-BLA

25 Neste Exemplo, são descritos experimentos para triar uma bibli-
oteca de esqueletopeptídeo-BLA. As placas COSTAR (96 cavidades) foram
revestidas com 0,5 µg (100 µL de 5 µg/mL) hVEGF₁₆₅ (Preprotech) com agi-
tação suave a 4 °C durante a noite, seguido por bloqueio com tampão de
bloqueio Superblock (Pierce) durante várias horas a temperatura ambiente.
30 As amostras purificadas com His-tag de pCM01 e pCM04 foram diluídas se-
rialmente em tampão de teste BLA e porções de 100 µl foram transferidas
para cavidades revestidas com VEGF. Após uma hora, as placas foram la-

vadas seis vezes com PBS, 0,05% TWEEN®-20 e 200 µL de tampão de teste de nitrocefina contendo 0,1 mg/ml nitrocefina (Oxoid) foram adicionados para medir a atividade de beta-lactamase residual ligada a Abs₄₉₀/min. As cavidades de controle continham pCB04 beta-lactamase como um controle (vide, Figura 7).

EXEMPLO 9

Inibição de Proliferação de Células HUVE por peptídeos aVEGF.

Neste Exemplo, são descritos experimentos conduzidos para determinar os efeitos de peptídeos aVEGF em células HUVE. As células HUVE (células de veia umbilical humana; Cambrex) foram passadas 1-5 vezes e mantidas de acordo com as instruções dos fabricantes. O crescimento de células HUVE foi estimulado por 0,03 a 20 ng/ml VEGF com a proliferação maior a 10 ng/ml VEGF₁₆₅. Esta concentração foi também usada em subseqüentes experimentos. Uma série de peptídeos a VEGF de 0,5 nM a 25 µM (e um controle de anticorpo monoclonal anti-VEGF (R&D Systems)) foram misturados com 10 ng/mL VEGF antes da adição a células HUVE semeadas em triplicata em placas de 96 cavidades. A proliferação de células foi medida por incorporação de ³H-timidina (vide, Figura 8). Significante inibição foi observada a 0,4 µM anti-VEGF.

EXEMPLO 10

Inibição de formação de tubos de vasos sangüíneos por conjugados VEGF Peptídeo

Neste Exemplo, são descritos experimentos conduzidos para avaliar a formação de tubos de vasos sangüíneos. Este teste de angiogênese *in vitro* foi obtido como um kit de Chemicon e usado de acordo com as instruções dos fabricantes.

Este teste provê um modelo simples de angiogênese em que a indução ou inibição da formação de tubos por sinais exógenos pode ser monitorada. Uma suspensão de células endoteliais de células HUVE de baixa passagem foi misturada com concentrações diferentes do inibidor na presença de 10 ng/mL VEGF, antes da adição das células a "ECMatrix" (*isto é*, uma solução que é polimerizada *in situ* e provê um gel sólido de proteínas

de base preparadas de modo que células endoteliais se alinham e formam estruturas similares a tubos ocos). A formação de tubos é um processo de múltiplas etapas envolvendo adesão, migração diferenciação e crescimento de células. A formação de tubos resultante foi medida sob um microscópio de luz invertida a uma ampliação de 20X-100X. A inibição significativa de formação de túbulos foi observada em concentrações acima de 1 μ M peptídeo.

EXEMPLO 11

Constructo de bibliotecas de peptídeos com tendências de VEGF apresentada na superfície com fagos

Neste Exemplo, são descritos experimentos conduzidos para bibliotecas de apresentação na superfície de fagos construídas. As bibliotecas de maturação por afinidade usados para a triagem de VEGF foram construídas usando o sistema de apresentação na superfície de fagos de gene III C7C bem-conhecido na técnica (vide, Noren e Noren [2001]). Oligonucleotídeos foram sintetizados e fosforilados como bem-conhecido na técnica. Os oligonucleotídeos usados para construir as bibliotecas empregam códons NNK (onde N = G, A, T, C e K= G ou T). O esquema de clonagem NNK elimina o potencial para dois códons de parada e ainda codifica todos os vinte aminoácidos. A biblioteca de peptídeo aleatória apresentou 9 aminoácidos aleatórios com duas cisteínas fixadas em posições 2 e 9 (XC(X)₇CGGGS; SEQ ID NO:31; X representa qualquer aminoácido). Sete bibliotecas de peptídeos com tendência CK37282 foram criadas usando os mesmos métodos como para a biblioteca aleatória.

EXEMPLO 12

Constructo de um inibidor de aVEGF Bowman Birk (BBI^{VEGF})

Neste Exemplo, é descrita constructo de uma constructo anti-VEGF BBI (BBI-AV). Um gene sintético codificando para inibidor de Bowman Birk (vide, Figura 9) com sítios de restrição apropriados para a introdução de seqüências de codificação de peptídeos pequenos no laço de tripsina (Sacl-EcoRI) e/ou laço de quimotripsina (EcoRI-SalI) foi clonado em pET-22b (Novagen) usando sítios de clonagem NdeI/XhoI de acordo com os proce-

dimentos padrões bem-conhecidos na técnica. O vetor resultante, pET BBI, foi usado como um gabarito para inserir as seqüências CK37281, CK37282 em laços BBI como cassetes de oligonucleotídeos de filamento duplo (Operon). Constructos foram transformadas em BL-21(DE3) *E coli*, e colocadas em meio contendo 50 µg/mL ampicilina. DNA Plasmídeo de clones individuais foi isolado usando métodos bem-conhecidos na técnica (Qiagen) e os insertos corretos confirmados por seqüenciamento de DNA. Os peptídeos de interesse adicionais incluem PS-AV1 (1KSAIC-KYYLYWW-CF1V; SEQ ID NO:16) e PS-AV2 (1KSAIC-TLWKSYW-CF1V; SEQ ID NO:17).

Proteínas de fusão e BBI de tipo foram expressados em fermentadores de 14-L. As pastas de células foram coletadas e as proteínas isoladas dos corpos de inclusão usando uma modificação do procedimento de triagem FoldIt (Hampton) (vide, Figura 10).

EXEMPLO 13

15 Análise de ligação BIAcore® de BBI-VEGF

Neste Exemplo, são descritos experimentos conduzidos para determinar a afinidade de ligação de constructos produzidas como indicado no exemplo 9. As afinidades de constructos BBI-VEGF para VEGF foram medidas usando um sistema de ressonância de plasmon de superfície BIAcore® 3000 (Biacore). Um chip sensor A CM5 foi condicionado com 50 mM NaOH, e ativado para copulação covalente de VEGF usando cloridrato de *N*-etil -*N*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxissuccinimida (NHS) de acordo com as instruções dos fabricantes (Biacore). VEGF (VEGF₁₆₅ humano Biosource) foi diluído a 5 µg/ml em 20 mM acetato de sódio, pH 4,8 e injetado a uma taxa de fluxo de 2 µl/min para obter aproximadamente 1000 a 6000 unidades de resposta (RU) de proteína copulada. Tripsina e quimotripsina foram similarmente copuladas para o chip sensor CM5 em aproximadamente 850 a 3500 RU em trilhas restantes. Uma solução de 1M etanolamina foi injetada como um agente de bloqueio. A afinidade de ligação seletiva para VEGF de BBI-VEGF reduplicado é mostrada em Figura 11.

EXEMPLO 14

Teste de Proliferação de células *In vitro* para testar a atividade de peptídeos inibidores de hVEGF

Neste Exemplo, são descritos experimentos conduzidos para determinar a atividade antiproliferativa de peptídeos anti-VEG. A atividade antiproliferativa de peptídeos inibidores de VEGF foi determinada usando células endoteliais de veia umbilical humanas (HUVEC) como a seguir. Uma passagem anterior (menor que seis) de HUVEC foi semeada em placas de 96 cavidades de 5000 células por cavidade e deixadas sem nutrientes durante 18 horas em 200 µl de meio EBM (Cambrex) sem fatores de crescimento e suplementados com 0,5% FBS, a 37 °C com 5% CO₂. O meio foi substituído com 180 µl de meio de crescimento contendo meio EBM com 5% soro bovino fetal e 1% DMSO. Então, 20 µl de VEGF preincubado durante uma hora com concentrações variadas de peptídeos (a concentração final de DMSO de todas as cavidades foi 1%) foram adicionados às cavidades para uma concentração final de VEGF de 10 ng/ml. Anticorpo VEGF humano (R & D Systems) foi usado como um controle positivo. As células com concentrações de 0,31 a 20 ng/ml de VEGF sozinho no meio de crescimento foram usadas para construir uma curva de crescimento padrão. As células foram ainda incubadas durante 48 horas e a proliferação de células foi medida usando um arranjo MTS (kit de teste de proliferação celular de uma solução aquosa CellTiter 96; Promega). Então, 40 µl da solução de tetrazólio MTS foram adicionados a cada cavidade e após 3 e 4 horas de incubação, as placas foram lidas a 490 nM. A absorção do meio sozinho foi subtraída de todos os pontos de dados. Os resultados indicaram que os peptídeos inibidores de VEGF CK37281 e CK37283 tem IC₅₀ na faixa micromolar.

EXEMPLO 15

Teste de curativos para ferimentos de repetição (RIPT) de um peptídeo anti-VEGF em pele humana

Neste Exemplo, são descritos experimentos conduzidos para determinar os resultados de teste de curativos para peptídeos anti VEGF. As amostras do peptídeo aVEGF CK37281 dosadas a 0,5% (p/v) foram formu-

ladas na formulação de base contendo água deionizada /butileno glicol. Aproximadamente 0,2 mL da formulação foi aplicado a 200 voluntários humanos em um teste de curativos para ferimentos repetidos de acordo com os procedimentos designados por Clinical Research Laboratories, Inc. (Piscataway, NJ). Os resultados indicaram que não se nota irritação dérmica ou sensibilização sobre a pele dos voluntários.

Tendo descrito as modalidades preferidas da presente invenção, será evidente para os versados na técnica que várias modificações podem ser feitas nas modalidades descritas, e que estas modificações se destinam a estar no escopo da presente invenção.

EXEMPLO 16

Produção de proteínas de fusão BCE103-BBI em *B. subtilis*

Neste Exemplo, experimentos conduzidos para produzir proteínas de fusão BCE103-BBI em *B. subtilis* são descritos. A sequência de DNA do gene sintético (Operon Technologies) codificando para a proteína pro-BBI com uma etiqueta de hexa-histidina C-terminal usada nestes experimentos é:

AACCTGCGTCTGTCTAAGCTTGGCCTGCTTATGAAATCAGACCATCAGC
ACAGCAATGACGATGAGAGCTCTAAACCCTGTTGCGATCAATGCGCATG
TACGAAATCAAATCCTCCACAGTGTCTGGTGTTCGATATGCGTCTGAAT
AGCTGTCATAGTGCATGCAAAAGCTGTATCTGCGCCCTGAGTTATCCAG
CTCAATGTTTTTTCGTCGACATCACGGACTTCTGCTATGAGCCATGTAAA
CCAAGCGAGGACGATAAAGAGAACCATCATCACCATCACCAT (SEQ ID NO:44)

A sequência de proteína de pro-BBI C-terminal hexa-histidina etiquetada codificada para o gene sintético acima é:

NLRLSKLGLLMKSDHQHSNDESSKPCCDQCACTKSNPPQCRCSMDMLN
SCHSACKSCICALSYPAQCFCVDITDFCYEPCKPSEDDKENHHHHHH (SEQ ID NO:45)

A porção da sequência de DNA do gene sintético que codifica para a forma madura principal de BBI é

GACGATGAGAGCTCTAAACCCTGTTGCGATCAATGCGCATGTACGAAAT

CAAATCCTCCACAGTGTCTGGTGTTCGGATATGCGTCTGAATAGCTGTCA
TAGTGCATGCAAAAGCTGTATCTGCGCCCTGAGTTATCCAGCTCAATGT
TTTTGCGTCGACATCACGGACTTCTGCTATGAGCCATGTAAACCAAGCG
AGGACGATAAAGAGAAC (SEQ ID NO:46)

5 A seqüência de proteína da forma madura principal de BBI codificado pelo gene sintético acima é:

DDESSKPCCDQCACTKSNPPQCRCSMDRLNSCHSACKSCICALSYPAQCF
CVDITDFCYEPCKPSEDDKEN (SEQ ID NO:47)

Os iniciadores PCR usados para amplificar o gene BBI para fusão no cassete de expressão de BCE103 no vetor pJ103 foram:

BBIfusion _FW: 5' CAGCACGGATCCAGACGATGAGAGCTCTAAACCC 3'
(SEQ ID NO:48)

BBIHindIII_RV: 5' CTGCAGAAGCTTAAAAATAAAAAACGGATTTTCCTTCA
GGAAATCCGTCCTCTGTAACTTTTAGTTCTCTTTATCGTCCTCGC 3'

15 (SEQ ID NO:49)

BBIHIS-HindIII_RV: 5' CTGCAGAAGCTTAAAAATAAAAAACGGATT
TCCTTCAGGAAATCCGTCCTCTGTAACTTTTAATGGTGATGGTGATGAT
GGTTCTC 3' (SEQ ID NO:50)

A seqüência do cassete de expressão *aprE*-BCE103-BBI-HisTag
20 (*EcoRI*-*HindIII*) que foi clonado no vetor de integração pJM103 é apresentada na Figura 14. Um mapa esquemático do plasmídeo do vetor de expressão pJM103BBIHIS é apresentado na Figura 15.

O gene de celulase alcalina (BCE103) (vide, van Soligen, Patente US Nº 6,063,611, incorporada aqui por referência) fundido na seqüência
25 de sinal e promotor *aprE* de *B. subtilis* foi clonado a partir de pUCAPR103 (Shaw *et al.*, J. Mol. Biol., 320:303-309 [2002]) como um fragmento *EcoRI*-*Bam*HI (isto é, um fragmento que transporta a seqüência de codificação de domínio catalítico BCE103 e primeiro ligante do domínio de ligação de celulose apenas) em pJM103 (Perego, "Integrational vectors for genetic manipulation in *Bacillus subtilis*" In, *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics, Sonenshein, Hoch, e
30 Losick (eds), American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 615-

624 [1993]). Um gene codificando o inibidor de protease Bowman-Birk de soja (BBI) (Swiss-Prot Acesso nº P01055; *Vide*, Odani e Ikenaka, J. Biochem., 71: 839-848 [1972]) com uma etiqueta hexa-histidina C-terminal (His-Tag) foi sintetizado por Operon Technologies (vide, sequência de DNA acima). O gene BBI foi amplificado por PCR com iniciadores (todos os iniciadores foram sintetizados por MWG Biotech, Oligos Etc., ou Operon Technologies) que geraram um sítio 5' *Bam*HI na matriz de leitura correta com o gene BCE103, e na extremidade 3' introduzida em um terminador transcripcional forte (LAT, do gene α -amilase de *Bacillus licheniformis*) após a extremidade do gene BBI com um sítio 3' *Hind*III para clonagem no vetor pJM103.

Os fragmentos com ou sem uma His-Tag C-terminal foram gerados com os iniciadores BBIfusion_FW (SEQ ID NO:48) e BBIHISHindIII_RV (SEQ ID NO:50), ou BBIfusion_FW (SEQ ID NO:48) e BBIHindIII_RV(SEQ ID NO:49), respectivamente, usando o gene BBI sintético como um gabarito. Salvo especificado em contrário, as reações PCR foram tipicamente realizadas em um termociclador por 30 ciclos com polimerase *Taq* High Fidelity Platinum (Invitrogen) de acordo com as instruções dos fabricantes (com uma temperatura de anelamento de 55°C). Os fragmentos de PCR foram clonados como fragmentos *Bam*HI-*Hind*III em pJM103 transportando o cassete de expressão *aprE*-BCE103. A sequência de genes correta foi verificada por seqüenciamento de DNA.

Assim, como mostrado na Figura 14, o N-término da região de codificação madura do gene BBI (com ou sem His-Tag) foi fundido em armazém com a região de codificação C-terminal da primeira sequência de ligante CBD (domínio de ligação de celulose) codificado pelo gene BCE103 celulase. Assim, os dois CBD's de BCE103 (Shaw *et al.*, *supra*) são substituídos por BBI nos vetores de expressão finais, pJM103BBI ou pJM103BBIhis (vide, Figura 15). O promotor *aprE* controla a expressão das fusões de genes BCE103-BBI (vide, Ferrari *et al.*, J. Bact., 170:289-295 [1988]; e Henner *et al.*, J. Bact., 170: 296-300 [1988]).

As células competentes de *Bacillus subtilis*, BG3934comK, foram transformadas com os plasmídeos de expressão, pJM103BBI ou

pJM103BBIhis. As bactérias foram tornadas competentes pela indução do gene *comK* sob o controle de um promotor indutível por xilose (Hahn *et al.*, Mol. Microbiol., 21:763-775 [1996]). Os transformantes foram selecionados em placas de ágar de caldo Luria (LA) contendo 5 µg/ml cloranfenicol. Para
 5 aumentar a expressão por amplificação dos genes, as colônias foram riscadas e cultivadas várias vezes em placas LA com 25 µg/ml de cloranfenicol até a taxa de crescimento com o antibiótico ser similar à taxa de crescimento na ausência de cloranfenicol. A proteína de fusão BCE103-BBI foi produzida por crescimento em frascos de agitação a 37 °C em meio TSB (caldo Tryp-
 10 tone Soya de OXOID, 30 g/L) ou em meio MBD, um meio definido à base de MOPS. O meio MBD foi feito essencialmente como descrito (Neidhardt *et al.*, J. Bacteriol., 119: 736-747 [1974]), exceto NH₄Cl₂, FeSO₄, e CaCl₂ foram deixados do meio de base, 3 mM K₂HPO₄ foi usado e o meio de base foi suplementado com 60 mM uréia, 75 g/L glicose, e 1 % soytone. Também, os
 15 micronutrientes foram completados como uma carga de 100 X contendo, em um litro, 400 mg FeSO₄ · 7H₂O, 100 mg MnSO₄ · H₂O, 100 mg ZnSO₄ · 7H₂O, 50 mg CuCl₂ · 2H₂O, 100 mg CoCl₂ · 6H₂O, 100 mg NaMoO₄ · 2H₂O, 100 mg Na₂B₄O₇ · 10H₂O, 10 ml de 1M CaCl₂, e 10 ml de 0,5 M citrato de sódio

A proteína de fusão BCE103-BBI pode ser facilmente visualiza-
 20 da em amostras de sobrenadantes isentos de células (após 24 h de crescimento em meio TSB ou 48 h em meio MBD) como a banda de proteína principal em géis SDS-PAGE (10 % NuPAGE em tampão MES, ciclado como descrito de acordo com as instruções dos fabricantes, Invitrogen) fluindo a ~ 44 kDa por uso de colorações de proteína padrões (por exemplo, GelCode
 25 Blue Stain Reagent; Pierce). A identidade de proteína de fusão BCE103-BBI foi verificada por imunoblots de géis SDS-PAGE usando os protocolos de acordo com as instruções dos fabricantes (Kit BM Chromogenic Western Blotting; Roche Applied Science usando um anticorpo anti-HisTag ou um anticorpo policlonal de celulase anti-BCE103 para detecção).

30 Para determinar a atividade de BCE103, degradação de celulase foi avaliada qualitativamente em placas de indicador de celulase LA (com 1% carboximetil celulose colorido com 0,2 % vermelho Congo, ou com 0,5 %

azo-CM-celulose, Megazyme), ou quantitativamente por um teste direto em tampão de teste (100 mM Tris pH 8,6, 0,005 % Tween-80) no caldo de cultura usando um substrato sintético, 4-nitrofenil β -D-celobiosídeo (Sigma), usando métodos bem-conhecidos na técnica (ver por exemplo, van Tilbeurgh *et al.*, Meth. Enzymol., 160:45-59 [1988]).

Os testes inibidores de tripsina foram realizados em tampão de teste para determinar a atividade de BBI. Especificamente, uma curva padrão foi gerada para fazer onze diluições em série 1:1 (100 μ L BBI + 100 μ L tampão de teste) de uma solução de BBI padrão de 2 μ g/mL. O BBI padrão foi purificado de 1 mg/ml de solução de inibidor de tripsina -quimotripsina (Sigma Cat. nº T-9777) em 20 mM MES pH 6,0 usando uma coluna de interação hidrofóbica (POROS HP2, coluna de fenila, Applied Biosystems). A coluna foi equilibrada com 20mM MES pH 6,0, carregada com 5 mg do inibidor, lavada com o tampão de equilíbrio e então o BBI foi eluído com água.

As amostras de BBI desconhecidas a serem testadas no teste inibidor foram diluídas como necessário, de modo que dois ou mais pontos de dados estivessem dentro da curva padrão (geralmente diluições de amostra de 1:10, 1:100, 1:200, 1:1000, 1:2000 foram testadas e então as diluições niveladas se necessário). Cada padrão ou amostra de BBI diluído, 20 μ L, foi adicionado a 80 μ L de 50 ng/ml de tripsina pancreática bovina (Worthington) (feita por diluição de uma carga de solução de 1 mg/mL de tripsina em um tampão de teste). Por conveniência, os padrões e amostras foram dispostos em placas de microtitulação de 96 cavidades. As reações foram misturadas e incubadas 15 min a 25 °C. Após a incubação, 100 μ L do substrato de tripsina a 0,5 mg/ml (diluído em tampão de teste de uma solução 100 mg/ml de DM-SO), Suc-AAPR-pNA (succinil-Ala-Ala-Pro-Arg-para-nitroanilídeo, Bachem), foram adicionados, misturados e o OD (A_{405}) foi monitorado durante 15 min, com 1 ponto no tempo registrado a cada 12 segundos usando Spectra Max 250 (Molecular Devices). Os pontos de dados foram usados para determinar o V_{max} para cada reação. A curva padrão foi gerada traçando em gráfico V_{max} versus concentração de BBI e foi configurado em uma curva de quatro parâmetros. Toda a configuração de dados foi feita usando software forneci-

do pelo fabricante (Molecular Devices). A concentração de BBI das amostras desconhecidas foi calculada da curva padrão. Alternativamente, a atividade de BBI foi medida usando o mesmo protocolo mas por determinação da inibição de quimotripsina pancreática bovina (Worthington) (quimotripsina foi usada na mesma concentração como a atividade de tripsina e quimotripsina foi medida por adição de 100 µL de um substrato de 0,4 mg/ml de quimotripsina, succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-para-nitroanilídeo, Bachem).

Títulos de ciclos de frascos agitados (500 ml meio MBD em frascos com anteparos de 2,8 L Fernbach 6, 37°C, 225 rpm, coletados 60 h após o crescimento) tipicamente na faixa de 0,4 – 0,9 mg/ml atividade BCE e 40 - 150 µg/ml atividade inibidora de BBI tripsina. No entanto, é contemplado que os títulos provavelmente podem ser melhorados ainda por otimização da cepa bacteriana, meio de cultura e condições de crescimento (aeração, temperatura, tempo de coleta, etc).

Além da fusão de BCE103 a BBI tipo selvagem, proteínas de fusão a variantes BBI e proteínas de fusão com vários ligantes entre BCE103 e BBI foram produzidos usando os métodos descritos acima, como descrito nos seguintes Exemplos. Além disso, proteínas de fusão foram também produzidas quando o BBI foi fundido no segundo ligante de CBD (BCE-cbdD-BBI; vide, Exemplo 19) tornando possível usar o primeiro CBD para auxiliar no processo de purificação.

EXEMPLO 17

Produção de peptídeos substituídos nos laços do sítio reativo de BBI como proteínas de fusão BCE103-BBI

Neste Exemplo, são descritos experimentos conduzidos para produzir peptídeos substituídos nos laços de sítio reativo de BBI como proteína de fusão BCE103-BBI. Os iniciadores, assim com outras seqüências usadas nas várias etapas destes experimentos são apresentados abaixo. A seqüência de 12BB1ck81 do sítio de fusão BCE103 (no sítio *Bam*HI) para a extremidade do gene é apresentada na Figura 16. Peptídeos contendo a seqüência CK37281 (ACYNLYGWTC (SEQ ID NO:43) foram inseridos em ambos os laços inibidores de tripsina e quimotripsina.

Os iniciadores usados para introduzir um sítio *EcoRI* no gene BBI usando mutagênese sítio-dirigida QuikChange® (Stratagene) foram:

BowBeco-F

5'-GATATGCGTCTGAATTCCTGTCATAGTGCAT (SEQ ID NO:51)

5 BowBeco-R

5'-ATGCACTATGACAGGAATTCAGACGCATATC (SEQ ID NO:52)

As seqüências dos oligonucleotídeos de DNA que foram aneladas e clonadas no gene BBI (*SacI-EcoRI*) para substituir o laço inibidor de tripsina com o peptídeo de ligação de VegF CK37281 foram:

10 1BBck81+

5'-CTAAACCCTGTTGCGATCAATGCGCATGTTATAATTT

GTATGGGTGGACTTGTCGCTGCAGCGATATGCGTCTG (SEQ ID NO:53)

1BBck81-

5'- AATTCAGACGCATATCGCTGCAGCGACAAGTCCACCCATACA

15 AATTATAACATGCGCATTGATCGCAACAGGGTTTAGAGCT (SEQ ID NO:54)

As seqüências dos oligonucleotídeos de DNA que foram aneladas e clonadas no gene BBI (*EcoI-SalI*) para substituir o laço inibidor de quimotripsina com o peptídeo de ligação de VegF CK37281 foram

2BBck81+

20 5'-

AATTCCTGTCATAGTGCCTGCAAAAGCTGCGCATGTTATAACCTGTACG

GGTGGACCTGTTTTTGCG (SEQ ID NO:55)

2BBck81-

5'-

25 TCGACGCAAAAACAGGTCCACCCGTACAGGTTATAACATGCGCAGCTTT
TGCAGGCACTATGACAGG (SEQ ID NO:56)

As seqüências de DNA dos pares de oligonucleotídeos usados para fazer cassetes para introduzir peptídeos nos laços de sítio reativo de tripsina (sítios de restrição *SacI* e *EcoRI*) ou quimotripsina (sítios de restrição *EcoRI* e *SalI*) do gene BBI sintético são dadas abaixo. Estas seqüências de codificação de peptídeos foram então movimentadas para o vetor de expressão de p2JM103BBI como fragmentos *SacI-SalI*.

30

Comstatina (1º laço)

CTAAACCCTGTTGCGATCAATGCGCATGTGTTGTTGAGGACTGGGGTCA
CCACCGTTGTCGCTGCAGCGATATGCGTCTG (SEQ ID NO:57)

e

- 5 AATTCAGACGCATATCGCTGCAGCGACAACGGTGGTGACCCCAGTCCT
GAACAACACATGCGCATTGATCGCAACAGGGTTTAGAGCT (SEQ ID
NO:58)

Comstatina (2º laço)

- CAAAAGCTGTATCTGCGTTGTTGAGGACTGGGGTCACCACCGTTGTTTT
10 TGCG (SEQ ID NO:59)

e

TCGACGCAAAAACAACGGTGGTGACCCCAGTCCTGAACAACGCAGATA
CAGCTTTTGCATG (SEQ ID NO:60)

C2c (1º laço)

- 15 CTAAACCCTGTTGCGATCAATGCAGCTGTGGTCGTAAAATCCCGATCCA
GTGTCGCTGCAGCGATATGCGTCTG (SEQ ID NO:61)

e

AATTCAGACGCATATCGCTGCAGCGACACTGGATCGGGATTTTACGACC
ACAGCTGCATTGATCGCAACAGGGTTTAGAGCT (SEQ ID NO:62)

- 20 C3c (1º laço)

CTAAACCCTGTTGCGATCAATGCGGTTGTGCTCGTTCTAACCTGGACGA
ATGTCGCTGCAGCGATATGCGTCTG (SEQ ID NO:63)

e

- AATTCAGACGCATATCGCTGCAGCGACATTCGTCCAGGTTAGAACGAGC
25 ACAACCGCATTGATCGCAACAGGGTTTAGAGCT (SEQ ID NO:64)

C4c (1º laço)

CTAAACCCTGTTGCGATCAATGCGGTTGTCAGCGTGCTCTGCCGATCCT
GTGTCGCTGCAGCGATATGCGTCTG (SEQ ID NO:65)

e

- 30 AATTCAGACGCATATCGCTGCAGCGACACAGGATCGGCAGAGCACGCT
GACAACCGCATTGATCGCAACAGGGTTTAGAGCT (SEQ ID NO:66)

C5c (1º laço)

CTAAACCCTGTTGCGATCAATGCCAGTGTGGTCGTCTGCACATGAAAAC
CTGTGCTGCAGCGATATGCGTCTG (SEQ ID NO:67)

e

AATTCAGACGCATATCGCTGCAGCGACAGGTTTTTCATGTGCAGACGACC
5 AACTGGCATTGATCGCAACAGGGTTTAGAGCT (SEQ ID NO:68)

Xa1 (2º laço)

AATTCCTGTCATAGTGCCTGCAAAAGCTGTATCTGCGCCCGTAGTTTGC
CAGCTCAATGTTTTTGCG (SEQ ID NO:69)

e

10 TCGACGCAAAAACATTGAGCTGGCAAACACTACGGGCGCAGATACAGCTTT
TGCAGGCACTATGACAGG (SEQ ID NO:70)

hSCC1 (1º laço)

CTAAACCCTGTTGCGATCAATGCAACTGTACGTACTCAACCCCTCCACA
GTGTGCTGCAGCGATATGCGTCTG (SEQ ID NO:71)

15 e

AATTCAGACGCATATCGCTGCAGCGACACTGTGGAGGGGTTGAGTACG
TACAGTTGCATTGATCGCAACAGGGTTTAGAGCT (SEQ ID NO:72)

As seqüências de DNA de pares de iniciadores de oligonucleotí-
deos usados para introduzir seqüências de peptídeos nos laços de sítio rea-
20 tivo de tripsina ou quimotripsina usando um kit de mutagênese sítio-dirigida
QuikChange® II XL (Stratagene) são dados abaixo. As reações foram reali-
zadas de acordo com as instruções dos fabricantes e descritas no exemplo.
Vinte ciclos foram realizados com extensões de 6 minutos a 68 °C, desnatu-
rações de 50 s a 95 °C, e anelamentos a 55 °C durante 50 s. Após os ciclos,
25 uma extensão final foi realizada a 68 °C durante 20 minutos.

1A (2º laço)

CTGTATCTGCAAACGCTCAAAATCTCGTGGCTGTTTTTGCGTCGACATC
AC (SEQ ID NO:73)

e

30 CGCAAAAACAGCCACGAGATTTTGAGCGTTTGCAGATACAGCTTTTGCA
TG (SEQ ID NO:74)

2B (2º laço)

CTGTATCTGCTGGTATAATCAAATGACAACATGTTTTTGCCTCGACATCA
C (SEQ ID NO:75)

e

CGCAAAAACATGTTGTCATTTGATTATAACCAGCAGATACAGCTTTTGCAT
5 G (SEQ ID NO:76)

4A (2º laço)

CTGTATCTGCCATCAACTTGGCCCGAATTCATGTTTTTGCCTCGACATCA
C (SEQ ID NO:77)

e

10 CGCAAAAACATGAATTCGGGCCAAGTTGATGGCAGATACAGCTTTTGCA
TG (SEQ ID NO:78)

5A (2º laço)

CTGTATCTGCCATCCGTGGGCACCGTATTCTTGTTTTTGCCTCGACATC
AC (SEQ ID NO:79)

15 e

CGCAAAAACAAGAATACGGTGCCACGGATGGCAGATACAGCTTTTGCA
TG (SEQ ID NO:80)

6-1A (2º laço)

CTGTATCTGCAATCTTCATTATCTTCAACAGTGTTTTTGCCTCGACATCA
20 C (SEQ ID NO:81)

e

CGCAAAAACACTGTTGAAGATAATGAAGATTGCAGATACAGCTTTTGCAT
G (SEQ ID NO:82)

7A (2º laço)

25 CTGTATCTGCACACCGTCTCTTTATCGCCCGTGTTTTTGCCTCGACATCA
C (SEQ ID NO:83)

e

CGCAAAAACACGGGCGATAAAGAGACGGTGTGCAGATACAGCTTTTGC
ATG (SEQ ID NO:84)

30 8B (2º laço)

CTGTATCTGCCTTACAGATCAATCTAAACCGTGTTTTTGCCTCGACATCA
C (SEQ ID NO:85)

- e
CGCAAAAACACGGTTTAGATTGATCTGTAAGGCAGATACAGCTTTTGCA
TG (SEQ ID NO:86)
- 9A (2º laço)
- 5 CTGTATCTGCGTTACAACATCAATGGGCATGTGTTTTTTCGTCGACATCA
C (SEQ ID NO:87)
- e
CGCAAAAACACATGCCCATTGATGTTGTAACGCAGATACAGCTTTTGCA
TG (SEQ ID NO:88)
- 10 10B (2º laço)
CTGTATCTGCCGCGCATCACCGTATGATTGGTGTTTTTTTCGTCGACATC
AC (SEQ ID NO:89)
- e
CGCAAAAACACCAATCATAACGGTGATGCGCGGCAGATACAGCTTTTGCA
15 TG (SEQ ID NO:90)
- 11-1A (2º laço)
CTGTATCTGCTCAACACAAAAAATTCCGCAATGTTTTTTCGTCGACATCA
C (SEQ ID NO:91)
- e
20 CGCAAAAACATTGCGGAATTTTTTGTGTTGAGCAGATACAGCTTTTGCA
G (SEQ ID NO:92)
- 12B (2º laço)
CTGTATCTGCACACAATTTTCGCTCTGCAACATGTTTTTTCGTCGACATCA
C (SEQ ID NO:93)
- 25 e
CGCAAAAACATGTTGCAGAGCGAAATTGTGTGCAGATACAGCTTTTGCA
TG (SEQ ID NO:94)
- 13A (2º laço)
CTGTATCTGCCCGGATCATGTTCCGCATCTTTGTTTTTTCGTCGACATCA
30 C (SEQ ID NO:95)
- e
CGCAAAAACAAAGATGCGGAACATGATCCGGGCAGATACAGCTTTTGCA

TG (SEQ ID NO:96)

15-1A (2º laço)

CTGTATCTGCTCAGGCTTTCCGCTTTCTACATGTTTTTGCGTCGACATCA
C (SEQ ID NO:97)

5 e

CGCAAAAACATGTAGAAAGCGGAAAGCCTGAGCAGATACAGCTTTTGCA
TG (SEQ ID NO:98)

1A6 (1º laço)

TCAATGCGCATGTGAAGAGATCTGGACTATGCTTTGCCGGTGTTCCGAT
10 ATGCGTC (SEQ ID NO:99)

e

CGGAACACCGGCAAAGCATAGTCCAGATCTCTTCACATGCGCATTGATC
GCAACAGG (SEQ ID NO:100)

1A6 (2º laço)

15 CAAAAGCTGTGCTTGTGAAGAGATCTGGACTATGCTTTGCTTTTGCGTC
GACATCACGG (SEQ ID NO:101)

e

ACGCAAAAGCAAAGCATAGTCCAGATCTCTTCACAAGCACAGCTTTTGC
ATGCACTATG (SEQ ID NO:102)

20 1C2 (1º laço)

TCAATGCGCATGTTGGGCCCTTACTGTCAAACATGCCGGTGTTCCGAT
ATGCGTC (SEQ ID NO:103)

e

CGGAACACCGGCATGTTTTGACAGTAAGGGCCCAACATGCGCATTGAT
25 CGCAACAGG (SEQ ID NO:104)

1C2 (2º laço)

CAAAAGCTGTGCTTGTGGGCCCTTACTGTCAAACATGCTTTTGCGTC
GACATCACGG (SEQ ID NO:105)

e

30 ACGCAAAAGCATGTTTTGACAGTAAGGGCCCAACAAGCACAGCTTTTGC
ATGCACTATG (SEQ ID NO:106)

2E2 (1º laço)

TCAATGCGCATGTCTTACAGTACTGTGGACTACATGCCGGTGTTCCGAT
ATGCGTC (SEQ ID NO:107)

e

CGGAACACCGGCATGTAGTCCACAGTACTGTAAGACATGCGCATTGATC
5 GCAACAGG (SEQ ID NO:108)

2E2 (2º laço)

CAAAAGCTGTGCTTGTCTTACAGTACTGTGGACTACATGCTTTTGCGTC
GACATCACGG (SEQ ID NO:109)

e

10 ACGCAAAGCATGTAGTCCACAGTACTGTAAGACAAGCACAGCTTTTGC
ATGCACTATG (SEQ ID NO:110)

2E5 (1º laço)

TCAATGCGCATGTACTCTTTGGAACAGATCTCCTTGCCGGTGTTCCGAT
ATGCGTC (SEQ ID NO:111)

15 e

CGGAACACCGGCAAGGAGATCTGTTCCAAAGAGTACATGCGCATTGAT
CGCAACAGG (SEQ ID NO:112)

2E5 (2º laço)

CAAAAGCTGTGCTTGTACTCTTTGGAATCGATCTCCTTGCTTTTGCGTCG
20 ACATCACGG (SEQ ID NO:113)

e

ACGCAAAGCAAGGAGATCGATTCCAAAGAGTACAAGCACAGCTTTTGC
ATGCACTATG (SEQ ID NO:114)

FGFns (1º laço)

25 TCAATGCGCATGTACAAACATCGATTCTACTCCTTGCCGGTGTTCCGAT
ATGCGTC (SEQ ID NO:115)

e

CGGAACACCGGCAAGGAGTAGAATCGATGTTTGTACATGCGCATTGATC
GCAACAGG (SEQ ID NO:116)

30 FGFns (2º laço)

CAAAAGCTGTGCTTGCACAAACATCGATTCTACTCCTTGTTTTTGCGTCG
ACATCACGG (SEQ ID NO:117)

e

ACGCAAAAACAAGGAGTAGAATCGATGTTTGTGCAAGCACAGCTTTTGC
ATGCACTATG (SEQ ID NO:118)

FGFkr (1º laço)

- 5 TCAATGCGCATGTACAAAAATCGATCGTACTCCTTGCCGGTGTTCGGAT
ATGCGTC (SEQ ID NO:119)

e

CGGAACACCGGCAAGGAGTACGATCGATTTTTGTACATGCGCATTGATC
GCAACAGG (SEQ ID NO:120)

- 10 FGFkr (2º laço)

CAAAAGCTGTGCTTGACAAAAATCGATCGTACTCCTTGTTTTTGCGTCG
ACATCACGG (SEQ ID NO:121)

e

- 15 ACGCAAAAACAAGGAGTACGATCGATTTTTGTGCAAGCACAGCTTTTGC
ATGCACTATG (SEQ ID NO:122)

FGFhl (1º laço)

TCAATGCGCATGTCACCTGCAGACAACTGAAACATGCCGGTGTTCGGAT
ATGCGTC (SEQ ID NO:123)

e

- 20 CGGAACACCGGCATGTTTCAGTTGTCTGCAGGTGACATGCGCATTGATC
GCAACAGG (SEQ ID NO:124)

FGFhl (2º laço)

CAAAAGCTGTGCTTGCCACCTGCAGACAACTGAAACATGTTTTTGCGTC
GACATCACGG (SEQ ID NO:125)

- 25 e

ACGCAAAAACATGTTTCAGTTGTCTGCAGGTGGCAAGCACAGCTTTTGC
ATGCACTATG (SEQ ID NO:126)

FGFgy (1º laço)

- 30 TCAATGCGCATGTGGCTACTTCATCCCATCGATTTGCCGGTGTTCGGAT
ATGCGTC (SEQ ID NO:127)

e

CGGAACACCGGCAAATCGATGGGATGAAGTAGCCACATGCGCATTGAT

- CGCAACAGG (SEQ ID NO:128)
 FGFgy (2º laço)
 CAAAAGCTGTGCTTGCGGCTACTTCATCCCATCGATTTGTTTTGCGTC
 GACATCACGG (SEQ ID NO:129)
- 5 e
 ACGCAAAAACAAATCGATGGGATGAAGTAGCCGCAAGCACAGCTTTTGC
 ATGCACTATG (SEQ ID NO:130)
 MM005 (1º laço)
 TCAATGCGCATGTTTACGTATCCTTGCTAACAAATGCCGGTGTTCCGATA
 10 TCGTC (SEQ ID NO:131)
 e
 CGGAACACCGGCATTTGTTAGCAAGGATACGTAAACATGCGCATTGATC
 GCAACAGG (SEQ ID NO:132)
 MM005 (2º laço)
- 15 CAAAAGCTGTGCTTGCTTACGTATCCTTGCTAACAAATGTTTTGCGTCG
 ACATCACGG (SEQ ID NO:133)
 e
 ACGCAAAAACATTTGTTAGCAAGGATACGTAAAGCAAGCACAGCTTTTGC
 ATGCACTATG (SEQ ID NO:134)
- 20 MM007 (1º laço)
 GCGATCAATGCGCCTGCAGAACTCAACCATATCCTTTATGTCGGTGTTT
 CGATATGCGTC (SEQ ID NO:135)
 e
 GGAACACCGACATAAAGGATATGGTTGAGTTCTGCAGGCGCATTGATCG
 25 CAACAGGGTTT (SEQ ID NO:136)
 MM007 (2º laço)
 CAAAAGCTGTGCCTGCAGAACACAACCTTACCCACTTTGTTTTGCGTC
 GACATCACGG (SEQ ID NO:137)
 e
- 30 ACGCAAAAACAAAGTGGGTAAGGTTGTGTTCTGCAGGCACAGCTTTTGC
 ATGCACTATG (SEQ ID NO:138)
 MM009 (2º laço)

CAAAAGCTGTGCCTGCCTGTTAACACCTACTCTTAACTGTTTTTGCGTCG
ACATCACGG (SEQ ID NO:139)

e

ACGCAAAAACAGTTAAGAGTAGGTGTTAACAGGCAGGCACAGCTTTTGC
5 ATGCACTATG (SEQ ID NO:140)

MM010 (1º laço)

TCAATGCGCATGCGCTCTTCCAACCTATTCTAACTGTCGGTGTTCGAT
ATGCGTCT (SEQ ID NO:141)

e

10 CGGAACACCGACAGTTAGAATGAGTTGGAAGAGCGCATGCGCATTGAT
CGCAACAGG (SEQ ID NO:142)

MM010 (2º laço)

CAAAAGCTGTGCCTGCGCGCTTCCTACACACTCTAACTGTTTTTGCGTC
GACATCACGG (SEQ ID NO:143)

15 e

ACGCAAAAACAGTTAGAGTGTGTAGGAAGCGCGCAGGCACAGCTTTTG
CATGCACTATG (SEQ ID NO:144)

MM017 (2º laço)

CAAAAGCTGTGCCTGCCCTTTAGGCCTTTGCCACCTTGTTTTTGCGTC
20 GACATCACGG (SEQ ID NO:145)

e

ACGCAAAAACAAGGTGGGCAAAGGCCTAAAGGGCAGGCACAGCTTTTG
CATGCACTATG (SEQ ID NO:146)

FGFps1 (2º laço)

25 AAGCTGTATCTGCTGGAACATCGATTCTACACCTTGTTTTTGCGTCGACA
TCACGG (SEQ ID NO:147)

e

ACGCAAAAACAAGGTGTAGAATCGATGTTCCAGCAGATACAGCTTTTGC
ATGCACT (SEQ ID NO:148)

30 FGFps2 (1º laço)

GCGATCAATGCATCTGTACTTGGATTGACAGTACTCCTTGTCGGTGTTC
CGATATGCGTC (SEQ ID NO:149)

e

GGAACACCGACAAGGAGTACTGTCAATCCAAGTACAGATGCATTGATCG
CAACAGGGTTT (SEQ ID NO:150)

FGFps2 (2º laço)

5 AAGCTGTATCTGCACATGGATCGATAGTACTCCTTGTTTTTGCCTCGACA
TCACGG (SEQ ID NO:151)

e

ACGCAAAAACAAGGTGTAGAATCGATCCATGTGCAGATACAGCTTTTGC
ATGCACT (SEQ ID NO:152)

10 FGFpsB (2º laço)

AAGCTGTATCTGTACATGGATCGATTGGACACCTTGTTTTTGCCTCGAC
ATCACGG (SEQ ID NO:153)

e

15 ACGCAAAAACAAGGTGTCCAATCGATCCATGTACAGATACAGCTTTTGC
ATGCACT (SEQ ID NO:154)

1A8 (2º laço)

CAAAGCTGCGCATGTGTTACTACAGATTGGATCGAATGTTTTTGCCTC
GACATCACGG (SEQ ID NO:155)

e

20 ACGCAAAAACATTCGATCCAATCTGTAGTAACACATGCGCAGCTTTTGC
ATGCACTATG (SEQ ID NO:156)

1A12 (2º laço)

CAAAGCTGTGCCTGCCCAACACTTTGGACTCATATGTGTTTTTGCCTC
GACATCACGGAC (SEQ ID NO:157)

25 e

ACGCAAAAACACATATGAGTCCAAAGTGTTGGGCAGGCACAGCTTTTGC
ATGCACTATGAC (SEQ ID NO:158)

1E11 (2º laço)

30 CAAAGCTGCGCATGTGTTACTACTCTCAATTCCACCAATGTTTTTGCCTCG
ACATCACGG (SEQ ID NO:159)

e

ACGCAAAAACATTGGTGAATTGAGAGTAGTAACATGCGCAGCTTTTGC

ATGCACTATG (SEQ ID NO:160)

TGFps1 (2º laço)

CAAAAGCTGTCTTTGTCCGGAAAACGATAACGTTTCTCCTTGTAATTGCG
TCGACATCACGGACTTCTG (SEQ ID NO:161)

5 e

TGTCGACGCAATTACAAGGAGAAACGTTATCGTTTTCCGGACAAAGACA
GCTTTTGCATGCACTATGAC (SEQ ID NO:162)

As seqüências de DNA dos pares de oligonucleotídeos usados para fazer
cassetes para introduzir seqüências de peptídeos em laços de sítios reativos
10 a quimotripsina do vetor de expressão p2JM103-Ink2-BBI são providos abai-
xo. Os cassetes foram ligados nos sítios de restrição *SphI* e *SalI* no vetor.

MM021 (2º laço)

CAAAAGCTGTGCTTGTAACACAACGTACGTCTTTTATGTTTTTGCG
(SEQ ID NO:163)

15 e

TCGACGCAAAAACATAAAAGACGTACGTTGTGTTTACAAGCACAGCTTTT
GCATG (SEQ ID NO:164)

VegT (2º laço)

CAAATCTTGCGCGTGCACACTTTGGAAATCTTACTGGTGTGTTTTGCG
20 (SEQ ID NO:165)

e

TCGACGCAAAAACACCAGTAAGATTTCCAAAGTGTGCACGCGCAAGATT
TGCATG (SEQ ID NO:166)

VegK (2º laço)

CAAATCTTGCGCATGTAAATATTACCTTTACTGGTGGTGTGTTTTGCG
25 (SEQ ID NO:167)

e

TCGACGCAAAAACACCACCAGTAAGGTAATATTTACATGCGCAAGATTT
GCATG (SEQ ID NO:168)

30 VegKD (2º laço)

CAAATCTTGCACTCTGTAAATATGATCTTTACTGGTGGTGTGTTTTGCG
(SEQ ID NO:169)

e

TCGACGCAAAAACACCACCAGTAAAGATCATATTTACAGATGCAAGATTT
GCATG (SEQ ID NO:170)

VegDK (2º laço)

- 5 CAAATCTTGCATCTGTGATTATAAACTTTACTGGTGGTGTTTTTGCG
(SEQ ID NO:171)

e

TCGACGCAAAAACACCACCAGTAAAGTTTATAATCACAGATGCAAGATTT
GCATG (SEQ ID NO:172)

- 10 As bibliotecas feitas de peptídeos limitados em cisteína são reagentes populares (por exemplo o kit de bibliotecas de peptídeo de apresentação na superfície de fagos PhD-C7C comercialmente disponível, NEB) para seleção de peptídeos que ligam a substratos de interesse. BBI tem dois laços de sítio reativo limitado em cisteína que são estruturalmente similares
- 15 aos laços de peptídeos apresentados em vários métodos usados para selecionar ligantes de peptídeos. Assim, uma vez que um peptídeo de ligação limitado em cisteína foi selecionado, BBI é apropriado para uso como um suporte "scaffold" para apresentar o peptídeo em uma reação de ligação.

- O peptídeo de ligação CK37281 (ver por exemplo, pedido de
- 20 patente US co-pendente, número de série 10/984,270, depositado em 8 de Novembro, 2004, incorporado aqui por referência) foi enxertado em BBI por substituição de tripsina, quimotripsina, ou ambos os laços de sítio reativo, com a sequência de peptídeo (ACYNLYGWTC)(SEQ ID NO:43) usando os cassetes de oligonucleotídeos DNA. Para facilitar a constructo, um sítio *E-*
- 25 *coRI* foi introduzido na região de codificação do gene BBI gene (sintetizado por encomenda por Operon Technologies; ver, Exemplo 16) entre os laços de sítio reativos de tripsina e quimotripsina por mutagênese sítio-dirigida QuikChange®, usando métodos descritos pelo fabricante (Stratagene) usando os iniciadores BowBeco-F e BowBeco-R, mostrados acima (0,5 pmol de
- 30 cada iniciador foi usado na reação QuikChange®; após uma etapa de desnaturação inicial de 97°C durante 3 minutos, 18 ciclos PCR de 68°C durante 12 minutos, 95°C durante 30 segundos e 55°C durante um minuto, seguido

por uma reação de extensão final durante 15 minutos a 68°C).

Para substituir o laço do peptídeo inibidor de tripsina, dois oligonucleotídeos DNA (IBBCK81+ e 1BBCK81-) foram anelados e ligados em sítios de restrição *SacI* e *EcoRI*. Do mesmo modo, para substituir o laço do peptídeo inibidor de quimotripsina, sítios *EcoRI* e *SalI* foram usados para
 5 inserção de um cassete de DNA feito por anelamento dos oligonucleotídeos (2BBCK81+ an 2BBCK81-). O peptídeo (ACYNLYGWTC)(SEQ ID NO:43) foi enxertado em ambos os laços por inserção do peptídeo no laço de quimotripsina (usando os oligonucleotídeos (2BBCK81+ an 2BBCK81-) após o laço
 10 de tripsina ser primeiro substituído pelo peptídeo. BBI com o peptídeo enxertado no laço de tripsina (1BBCK81) foi movimentado no vetor de expressão pJM103BBI como um fragmento *SacI-SphI*. BBI com o peptídeo enxertado no laço de quimotripsina (2BBCK81), ou ambos os laços (12BBCK81), foi movimentado em pJM103BBI como os fragmentos *SacI-SalI*. As seqüências
 15 corretas foram verificadas por seqüenciamento de DNA (a seqüência de gene 12BBCK81 é mostrada na Figura 16). Os vetores resultantes, pJM103-1BBCK81, pJM103-2BBCK81, ou pJM103-12BBCK81, foram usados para transformar BG3934comK de *B. subtilis*, e a produção das proteínas de fusão BCE foi determinada como no exemplo 16, acima.

20 A proteína de fusão fluindo a ~ 44 kDa foi detectada por SDS-PAGE como sendo a proteína principal presente no caldo isento de células. Apesar de que em alguns casos, se tem uma degradação significativa (até 50 %) da porção BBI (especialmente após > 48 h de crescimento em meio MBD), como observado pela presença de uma proteína proeminente fluindo
 25 a ~ 34 kDa correspondendo ao núcleo catalítico BCE103. Nestes casos, os títulos de BCE103 celulase foram similares aos medidos com fusões para o BBI tipo selvagem (Exemplo 16), mas a atividade de BBI (inibição de tripsina com 2BBCK81, ou inibição de quimotripsina com 1BBCK81) foi geralmente cerca de duas vezes menor.

30 Para reduzir a degradação proteolítica de variantes de BBI durante o crescimento (isto é, diminuição da quantidade do número de BCE103 celulase presente em géis de SDS-PAGE em comparação com a proteína de

fusão), uma cepa de *Bacillus subtilis* com nove genes de protease deletados, BG6006 (*degU^{Hy}32*, *oppA*, Δ *spoII*E3501, Δ *aprE*, Δ *nprE*, Δ *epr*, Δ *ispA*, Δ *bpr*, Δ *vpr* Δ *wprA*, Δ *mpr-ybjF*, Δ *nprB*, *amyE::xylRPxylAcomK-ermC*), foi usada como um hospedeiro de expressão, e a temperatura de crescimento (35 °C) e aeração (200 rpm) foram reduzidas. Com estas mudanças, uma banda de proteína de fusão principal (~ 44 kDa) foi observada em géis SDS-PAGE com uma banda insignificante presente no peso molecular esperado para a proteína de núcleo catalítico BCE (~34 kDa).

Além do peptídeo acima, vários outros peptídeos limitados em cisteína foram produzidos quando substituídos nos laços do sítio reativo a tripsina e/ou quimotripsina de BBI fundido ao C-término de BCE103 celulase. Os exemplos específicos incluíam:

(1) peptídeos projetados ou selecionados como antagonistas complementos, constatina introduzida nos 1º ou 2º laços de sítio reativo (vide, Sahu *et al.*, J. Immunol., 157: 884-891, [1996]), C2c (1º laço), C3c (1º laço), C4c (1º laço) e C5c (1º laço); ou peptídeos selecionados em uma reação de ligação de Fator B 1B, 2B, 4A, 5A, 6-1A, 7A, 8B, 9A, 10B, 11-1A, 12B, 13A, e 15-1A (todos no 2º laço);

(2) peptídeos projetados para ligar ao Fator Xa de proteases ou quimotripsina de estrato córneo, Xa1 (2º laço) ou hSCC1 (1º laço), respectivamente;

(3) peptídeos selecionados em reações de ligação de FGF5 1A6 (1º ou 2º laço), 1C2 (1º ou 2º laço), 2E2 (1º ou 2º laço), 2E5 (1º, 2º ou ambos os laços), FGFns (1º ou 2º laço), FGFkr (1º ou 2º laço), FGFhl (1º ou 2º laço), FGFgy (1º ou 2º laço), MM005 (1º ou 2º laço), MM007 (1º, 2º ou ambos os laços), MM009 (2º laço), MM010 (1º, 2º ou ambos os laços), MM017 (2º laço), FGFps1 (2º laço), FGFps2 (1º, 2º ou ambos os laços), e FGFpsB (2º laço); e

(4) peptídeos selecionados em reações de ligação de TGFβ-1 1A8 (2º laço), 1A12 (2º laço), 1E11 (2º laço), TGFps1 (2º laço), e MM021 (2º laço)

(5) peptídeos selecionados em reações de ligação de VEGF

VegK (2º laço), VegT (2º laço), VegKD (2º laço), e VegDK (2º laço),

Os oligonucleotídeos usados para introduzir estes peptídeos em laços de sítio reativo de tripsina (1º laço) ou quimotripsina (2º laço) e métodos usados para enxertar estes peptídeos em BBI, são providos abaixo. Em todos os casos, as proteínas de fusão foram produzidas como determinado por géis SDS-PAGE. No entanto, com alguns peptídeos substituídos, a quantidade de proteína de fusão intacta foi aumentada por redução da degradação proteolítica como descrito acima para o peptídeo enxertado (ACYNLYGWTC) (SEQ ID NO:43).

10 EXEMPLO 18

Ativação de BBI por agentes redutores/oxidantes de tiol

Após crescimento, a atividade de BBI (por inibição de tripsina ou quimotripsina) é tipicamente algumas 5 – 20 vezes menor do que a que seria esperada da atividade da BCE103 celulase medida nos sobrenadantes isentos de células (as duas moléculas devem estar presentes em uma relação molar 1:1 na proteína de fusão). Um aumento na atividade de BBI (medida por inibição de tripsina ou de quimotripsina) na proteína de fusão BCE103-BBI pode ser obtido por rotina por adição de BME, tipicamente concentrações de 1-4 mM adicionadas ao meio de crescimento de MBD cerca de 14 h após a inoculação. A atividade de inibição de tripsina ou quimotripsina de BBI na proteína de fusão é também menor do que esperado quando peptídeos de ligação (por exemplo peptídeo de ligação VegF CK37281) substitui o laço do sítio reativo tripsina ou quimotripsina, respectivamente. Como com o BBI de tipo selvagem, a atividade inibidora pode ser aumentada por tratamento com BME. Inesperadamente, outros agentes redutores de tiol (por exemplo cisteína, glutathione reduzida, DL-ditiotreitol e Tris[2-carboxietil] fosfina) tem poucos ou negligenciáveis efeitos sobre a ativação de BBI durante o crescimento nestas experiências. Também, adições de antioxidantes (por exemplo, ácido ascórbico ou acetato de DL- α -tocoferol) ou outros adjuvantes ao meio de crescimento (por exemplo, isoleucina, óleo de soja, Tween-80), ou crescimento a 30°C não aumentam de modo significativo a relação de atividade de BCE103:BBI.

Especificamente, para determinar a ativação de BBI durante o crescimento, culturas de *B. subtilis* BG6006 transformadas com 2JM103-E3-2BB1ck81 (vide, Exemplo 19, abaixo) foram cultivadas em 40 ml de meio MBD frascos de agitação de 250 ml a 37°C durante 13 h. Então, os agentes
5 redutores de tiol, indicados no gráfico na figura 17, foram adicionados e os sobrenadantes de células coletadas após 62 h de crescimento. Os reagentes 2-mercaptoetanol (BME), cisteína (Cys), glutathiona reduzida (Glut), e DL-ditiotreitol (DTT) foram adicionados ao meio de crescimento nas concentra-
10 ções finais indicadas no gráfico apresentado na Figura 17. Concentrações de 5 mM β ME podem resultar em melhores relações de atividade de BCE103:BBI, mas tipicamente resultam em uma diminuição global em ambos os títulos de BCE103 e BBI (vide, Figura 17), pelo menos parcialmente devido à redução em crescimento bacteriano causado pelo reagente adicionado. Títulos de BCE103 e 2BB1ck81 foram determinados usando os testes
15 descritos em exemplo 16.

A ativação de BBI foi também obtida após purificação parcial das proteínas de fusão (por exemplo BCE-Ink2-2BB1ck81; Ver, Exemplo 19, abaixo) por cromatografia de troca iônica Q-Sepharose.

A proteína de fusão foi purificada a partir de caldo sem células
20 obtido dos frascos de agitação ou ciclos do fermentador. O caldo foi filtrado, diluído cinco a dez vezes em água e o pH ajustado a pH 7,5 – 8,0. A amostra diluída foi carregada em uma coluna compactada com resina Q-Sepharose (GE Healthcare). A coluna foi lavada com 50 mM Tris pH 7,5 e então lavada novamente com o mesmo tampão contendo 300 mM NaCl. A
25 proteína de fusão foi eluída no mesmo tampão com 700 mM NaCl.

Para ativar o BBI, as frações de proteína de fusão reunidas foram diluídas dez vezes em tampão de teste, então tratadas com 2 mM β ME e 0,2 mM glutathiona oxidada (GSSG) com mistura constante em uma placa de agitação ou plataforma oscilante durante cerca de 24 h à temperatura
30 ambiente. O BBI pode ser geralmente ativado a cerca de 70 – 100 % da atividade inibidora de tripsina esperada com base na concentração medida da BCE103 celulase. Apesar do método de ativação descrito acima geralmente

dar os melhores resultados, em alguns casos, a fim de maximizar a ativação de uma dada amostra, triagens foram realizadas em placas de 96 cavidades para determinar as condições ótimas. Inicialmente, as condições típicas triadas da diluição em tampão de teste (por exemplo, séries de diluição de 2-50
5 vezes), a concentração de β ME (por exemplo, séries entre 0,5–5 mM) e concentração de glutathione oxidada (por exemplo 0 mM, então uma série de 1/20 a 1/2 a concentração de β ME).

A ativação da proteína de fusão BCE-Ink2-2BBIck81 é mostrada na Figura 18. Neste exemplo específico, a proteína de fusão de uma purificação Q-Sepharose foi diluída em 1:10 em PBS de Dulbecco (Mediatech)
10 com 0,005 % TWEEN®-80. Beta-mercaptoetanol foi adicionado a uma concentração final de 3 mM e incubado durante a noite em temperatura ambiente em um girador. A amostra foi ainda incubada à temperatura ambiente durante cerca de 60 h com agitação vigorosa em uma placa de agitação magnética. Os títulos de BCE103 e 2BBIck81 (antes e após tratamento com β ME) foram determinados por testes de celulase e testes inibidores de tripsina, respectivamente.
15

Em algumas modalidades, como para ativação de BBI ou de seus variantes em caldo isento de células de fermentações de volume grande, é desejável reduzir a diluição e concentração de β ME na reação de ativação. Isto pode ser obtido usando concentrações maiores de tampão (500 mM Tris pH 8,6), ou mudando para tampões zwitteriônicos, como CHES (também CAPS, Tricine, TAPS, e outros tampões zwitteriônicos apropriados). For exemplo, o caldo isento de células (ou frações de proteína de fusão purificadas por cromatografia de troca iônica) foi diluído 1:1 em 375 mM
25 CHES pH 8,6 com 0,005 % TWEEN®-80, então ativado com 1 mM β ME e 10 mM Na_2SO_3 e incubado com agitação em temperatura ambiente durante cerca de 24 h. BBI ou seus variantes, como proteínas de fusão BCE103 celulase, foram ativados por rotina por este método a 70 – 100 % do valor esperado (com base em atividades de BCE103 celulase).
30

Em algumas outras modalidades, é desejável ativar BBI ou seus variantes no caldo de fermentação completo com as células presentes. Por

exemplo, em alguns experimentos, caldo total foi diluído 1:1 em 250 mM glicina pH 9,0 com 0,05 % TWEEN®-80, e então ativado com 2 mM β ME e 10 mM Na_2SO_3 (ou com 10 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ sozinho) e incubado com agitação em temperatura ambiente durante cerca de 24 h. BBI ou seus variantes, como

5 proteínas de fusão BCE103 celulase, foram ativados por rotina por este método a 30 – 100 % do valor esperado (com base em atividades de BCE103 celulase).

EXEMPLO 19

Liberção de BBI livre/variantes por clivagem das proteínas de fusão

10 BCE103-BBI

Este Exemplo descreve experimentos desenvolvidos para liberar BBI livre ou seus variantes por clivagem das proteínas de fusão BCE103-BBI.

As seqüências dos pares de DNA oligonucleotídeos que foram

15 anelados e ligados em sítios *Bam*HI e *Sac*I de pJM103-BBI para gerar sítios de clivagem em potencial durante o crescimento de culturas entre o domínio catalítico BCE103 e BBI são providos abaixo.

BCEsubBBI (uma seqüência de peptídeos sensível a tipo subtilisina)

GATCCAGGTGGAGCTGCTTTAGTTGACGATGAGAGCT (SEQ ID NO:173)

20 e

CTCATCGTCAACTAAAGCAGCTCCACCTG (SEQ ID NO:174)

BCEcbdLBBI (a porção do 1º CBD)

GATCCAGGTGAACCTGACCCAACTCCTCCATCTGATCCTGGAGAATACC
CAGCTTGGGACGATGAGAGCT (SEQ ID NO:175)

25 e

CTCATCGTCCCAAGCTGGGTATTCTCCAGGATCAGATGGAGGAGTTGG
GTCAGGTTACCTG (SEQ ID NO:176)

BCEproBBI (o pró-peptídeo completo de BBI)

GATCCGGCGAACCTGCGTCTGTCTAAGCTTGGCCTGCTTATGAAATCAG
30 ACCATCAGCACAGCAATGACGATGAGAGCT (SEQ ID NO:177)

e

CTCATCGTCATTGCTGTGCTGATGGTCTGATTTTCATAAGCAGGCCAAGC

TTAGACAGACGCAGGTTGCGCCG (SEQ ID NO:178)

BCEshortproBBI (uma porção C-terminal do pró-peptídeo de BBI)

GATCCAAAATCAGACCATCAGCACAGCAATGACGATGAGAGCT (SEQ ID NO:179)

5 e

CTCATCGTCATTGCTGTGCTGATGGTCTGATTTTG (SEQ ID NO:180)

As seqüências do par de DNA oligonucleotídeo que foi anelado e ligado nos sítios *Bam*HI e *Sac*I de p2JM103-BBI para fundir BBI no 2º ligante CBD de BCE103 celulase são dadas abaixo.

10 BCEcbdDBBI

GATCCAGGAGAACCGGACCCAACGCCCCCAAGTGATCCAGGAGAGTAT
CCAGCATGGGATTCAAATCAAATTTACACAAATGAAATTGTGTATCATAA
CGGTCAGTTATGGCAAGCGAAATGGTGGACACAAAATCAAGAGCCAGG
TGACCCATACGGTCCGTGGGAACCACTCAAATCTGACCCAGATTTCAGAC

15 GATGAGAGCT (SEQ ID NO:181)

e

CTCATCGTCTGAATCTGGGTCAGATTTGAGTGGTTCCACGGACCGTAT
GGGTCACCTGGCTCTTGATTTTGTGTCCACCATTTGCTTGCCATAACT
GACCGTTATGATACACAATTTCAATTTGTGTAAATTTGATTTGAATCCCATG
20 CTGGATACTCTCCTGGATCACTTGGGGGCGTTGGGTCCGGTTCTCCTG
(SEQ ID NO:182)

As seqüências de peptídeo susceptíveis à clivagem de ácido entre resíduos de ácido aspártico e prolina são dadas abaixo.

Ligante 1 – WGDPHY (SEQ ID NO:183)(Lidell *et al.*, J. Biol. Chem. 278:13944-51 [2003])

Ligante 2 – DNNDPI (SEQ ID NO:184)(Segalas *et al.*, FEBS Lett., 371:171-175 [1995])

Ligante 3 – VVADPN (SEQ ID NO:185)(Kemperman *et al.*, Appl. Env. Microbiol., 69:1589–1597 [2003])

30 Os iniciadores de oligonucleotídeos usados para introduzir um sítio *Bss*HI em pJM103BBI por mutagênese sítio-dirigida QuikChange® são dados abaixo.

BCEbss-F

5'-TGGCGTTTCAGCAACATGAGCGCGCAGGCTGATGATTA (SEQ ID NO:186)

BCEbss-R

5'-TAATCATCAGCCTGCGCGCTCATGTTGCTGAACGCCA (SEQ ID NO:187)

- 5 Seqüências dos DNA oligonucleotídeos que foram anelados como um cassete (*Sall-HindIII*) para introduzir sítios *HindIII* e *XhoI* após o códon de laço de BBI, para introduzir um sítio *PacI* após o LAT, e remover o sítio *HindIII* original são dadas abaixo.

BCEterm+

- 10 5'-GACATCACGGACTTCTGCTATGAGCCATGTAAACCAAG
CGAGGACGATAAAGAGAACTAAAAGCTTAAGTTCGAGGTTAACAGAGGAC
GGATTTCTGAAGGAAATCCGTTTTTTTATTTTAAATTAAG (SEQ ID NO:188)

BCEterm-

- 15 5'-AGCTCTTAATTAATAAAAAACGGATTTCTTCAGG
AAATCCGTCCTCTGTAAACCTCGAGTTAAGCTTTTAGTTCTCTTTATCGT
CCTCGCTTGGTTTACATGGCTCATAGCAGAAGTCCGTGATG (SEQ ID NO:189)

- 20 Iniciadores PCR usados para gerar os ligantes lábeis em ácido aqui providos acima (isto é, Ligante 1, Ligante 2, e Ligante 3) inseridos entre o domínio catalítico BCE103 e BBI são dados abaixo.

BCE103coreBssHII_FW

5'-CAGCAACATGAGCGCGCAGGCTG (SEQ ID NO:190)

linkerWGDPHY_RV

- 25 5'-ATCGTCTGGATCCGGATAGTGGGGGTCTCCCCAAGAT
GCTGATTCTCTTATTTTTTCCC (SEQ ID NO:191)

linkerDNNDPI_RV

5'-ATCGTCTGGATCCGGTATGGGATCATTGTTGTCAGATG
CTGATTCTCTTATTTTTTCCC (SEQ ID NO:192)

linkerVVADPN_RV

- 30 5'-ATCGTCTGGATCCGGGTTGGGATCTGCAACTACAGA
TGCTGATTCTCTTATTTTTTCCC (SEQ ID NO:193)

Os iniciadores PCR usados para gerar os ligantes lábeis em á-

cido providos acima, (isto é, Ligante 1, Ligante 2, e Ligante 3) inseridos no 1º ligante CBD.

BCE103corePstI_FW

GCATAAGGAT GAGTCATCTG CAGCG (SEQ ID NO:194)

5 LplusWGDPHY_RV

5'-ATCGTCTGGATCCGGATAGTGGGGGTCTCCCCACGGT

TCTCCTGGATCAGATGGCGG (SEQ ID NO:195)

LplusDNNDPI_RV

5'-ATCGTCTGGATCCGGTATGGGATCATTGTTGTCCGGTT

10 CTCCTGGATCAGATGGCGG (SEQ ID NO:196)

LplusVVADPN_RV

5'-ATCGTCTGGATCCGGGTTGGGATCTGCAACTACCG

GTTCTCCTGGATCAGATGGCGG (SEQ ID NO:197)

15 A seqüência de proteína dos ligantes lábeis em ácido inseridos entre o domínio catalítico BCE103 e BBI é apresentada abaixo. Os ligantes lábeis em ácido são mostrados em tipo em negrito e as seqüências do primeiro domínio CBD são sublinhadas.

Ligante 1

BCE-**WGDPHY-PDP**-BBI (SEQ ID NO: 198)

20 Ligante 2

BCE-**DNNDPI-PDP**-BBI (SEQ ID NO:199)

Ligante 3

BCE-**VVADPN-PDP**-BBI (SEQ ID NO:200)

LinkerPlus 1

25 BCE-**IPPSDPTPPSDPGEP-WGDPHY-PDP**-BBI (SEQ ID NO:201)

LinkerPlus 2

BCE-**IPPSDPTPPSDPGEP-DNNDPI-PDP**-BBI (SEQ ID NO:202)

LinkerPlus 3

BCE-**IPPSDPTPPSDPGEP-VVADPN-PDP**-BBI (SEQ ID NO:203)

30 As seqüências dos pares de DNA oligonucleotídeos que foram aneladas e ligadas nos sítios *Bam*HI e *Sac*I de pJM103-BBI para gerar sítios de clivagem potenciais entre o domínio catalítico de BCE103 e BBI durante o

processo de purificação são dadas abaixo.

BCEentBBI (sítio de clivagem de Enteropeptidase)

GATCCAGGTGGAGACGACGATGACAAAGACGATGAGAGCT (SEQ ID NO:204)

5 e

CTCATCGTCTTTGTCATCGTCGTCTCCACCTG (SEQ ID NO:205)

BCEgenen1BBI (sítio de clivagem de Genenase I)

GATCCAGGTGCTGCTCATTACGACGATGAGAGCT (SEQ ID NO:206)

e

10 CTCATCGTCGTAATGAGCAGCACCTG (SEQ ID NO:207)

As seqüências dos pares de DNA oligonucleotídeos que foram aneladas e ligadas nos sítios *Bam*HI e *Sac*I de pJM103-Ink2-1BB1ck81 para gerar sítios de clivagem em potencial entre o domínio catalítico BCE103 e BBI durante o processo de purificação são dadas abaixo.

15 BCEfurinBBI (sítio de clivagem de Furin/Blisterase)

GATCCACGTGCTAAAAGAGACGATGAGAGCT (SEQ ID NO:208)

e

CTCATCGTCTCTTTTAGCACGTG (SEQ ID NO:209)

BCEgenen2BBI (sítio de clivagem de Genenase I)

20 GATCCAGGCGCTGCACACTACAACGACGATGAGAGCT (SEQ ID NO:210)

e

CTCATCGTCGTTGTAGTGTGCAGCGCCTG (SEQ ID NO:211)

BCEfleBBI (sítio de clivagem de Mpr)

GATCCATTCCTTGAAGACGATGAGAGCT (SEQ ID NO:212)

25 e

CTCATCGTCTTCAAGGAATG (SEQ ID NO:213)

Seqüências dos pares de iniciadores de oligonucleotídeos usados para introduzir os ligantes E e E3 em Ligante 2 por mutagênese sítio-dirigida QuikChange (Stratagene) são dadas abaixo.

30 BCE-Elnk-BBI (sítio de clivagem Mpr)

CCCATACCGGAGCCAGACGATGAGAGCTC (SEQ ID NO:214)

e

CATCGTCTGGCTCCGGTATGGGATCATTGTTG (SEQ ID NO:215)

A sequência de proteína do ligante E3 entre o domínio catalítico de BCE103 e BBI foi DNNDPIPEPDDESFNMPIPEP (SEQ ID NO:216). Nesta sequência, o Ligante E é sublinhado e a sequência gerada pela recombinação imperfeita em *E. coli* é mostrada em tipo negrito. A clivagem por Mpr (ou protease V8) pode ocorrer após qualquer um dos três ácidos glutâmicos presentes no Ligante E3. Assim, a estrutura foi BCE-(SEQ ID NO:216)-BBI.

As sequências dos pares de DNA oligonucleotídeos que foram aneladas e ligadas nos sítios *Bam*HI e *Sac*I de p2JM103-Ink2-2BB1ck81 para gerar sítios de clivagem em potencial de Genenase I entre o domínio catalítico de BCE103 e BBI são dadas abaixo.

BCEgenen3BBI

GATCCAGGCGCTGCACACTACAAATCAGACCATCAGCACAGCAATGAC
GATGAGAGCT (SEQ ID NO:217)

15 e

CTCATCGTCATTGCTGTGCTGATGGTCTGATTTGTAGTGTGCAGCGCCT
G (SEQ ID NO:218)

BCEgenen4BBI

GATCCAGGCGCTGCACACTACGTAGAATTTCAAGACGATGAGAGCT
20 (SEQ ID NO:219)

e

CTCATCGTCTTGAAATTCTACGTAGTGTGCAGCGCCTG (SEQ ID NO:220)

A sequência de proteína de um sítio de clivagem sensível a Genenase I (também sensível a ácido e Mpr) inserida entre o domínio catalítico BCE103 e BBI foi DNNDPIPDPGAAHYVEFQ (SEQ ID NO:221). O sítio de Genenase I (Ligante Gen4) está em negrito (a clivagem ocorre entre tirosina e valina) (NEB) e Ligante 2 é sublinhado. A clivagem por Mpr também pode ocorrer após o ácido glutâmico que se a valina no ligante de Gen4. A sequência usada aqui foi BCE-SEQ ID NO:221)-BBI.

30

Os sítios de clivagem na proteína de fusão BCE103-Ink2-2BB1ck81 são indicados abaixo. Os sete aminoácidos C-terminais do domínio catalítico de BCE103 (sublinhado), sequência de ligante 2 (tipo negrito),

e seqüências 2BBlck81 são mostrados. As ligações Asp-Pro lábeis em ácido/calor são indicadas com setas de ponta sólida e as ligações sensíveis a Mpr após os ácidos glutâmicos são indicadas com setas de ponta de linha.

5 ↓ ↓ ↓ ↓
 ...KIREASDNDPIPDPDDESSKPCCDQCACTKSNPPQCRCSDMRLNSCHSACK
 SCACYNLYGWTCFCVDITDFCYEPCKPSEDDKEN (SEQ ID NO:222)

ou suas variantes, a metade BBI necessita ser clivada da proteína de fusão BCE103 BBI.

10 Em algumas modalidades, isto é, obtido durante o crescimento, por proteases intrinsecamente produzidas por *B. subtilis*. Em algumas modalidades alternativas, esta clivagem ocorre após o crescimento, durante o processo de purificação (por exemplo por ácido /calor ou clivagem proteolítica). Os ligantes potencialmente susceptíveis à clivagem durante o crescimento foram projetados (vide, acima, sub, cbdL, pro, shortpro, e cbdD) e
 15 clonados em vetores de expressão pJM103BBI ou p2JM103BBI como os cassetes *Bam*HI-SacI. A produção de proteína de fusão versus domínio catalítico BCE103 foi analisada em géis SDS-PAGE como descrito em exemplo
 16.

20 Uma pequena clivagem da proteína de fusão foi observada para todos os ligantes, exceto para o pró-ligante, que foi quase completamente clivado de modo que uma proteína de fusão intacta, muito pequena, foi observada em géis, apesar de se ter uma grande correspondendo ao núcleo catalítico BCE103. Infelizmente, esta clivagem durante o crescimento resultou em atividade negligenciável de BBI medida em sobrenadantes isentos de
 25 células e nenhum BBI pode ser identificado em géis SDS-PAGE. Apesar não se pretender que a presente invenção seja limitada a um mecanismo ou teoria em particular, é possível que o BBI seja particularmente sensível à degradação proteolítica em sua forma inativa. Assim, clivagem durante o processo de purificação após ativação é geralmente preferido.

30 Em algumas modalidades, as ligações entre os resíduos de ácido aspártico e prolina são clivados por tratamento térmico em um pH ácido, como é bem-conhecido na técnica (ver por exemplo, Landon, Meth. Enzy-

mol., 47:145-149 [1977]). O 1º ligante de CBD em BCE103 celulase tem três seqüências Asp-Pro dipeptídeo (vide, Figura 14) com o potencial a ser clivado por tratamento ácido/ calor. No entanto, a clivagem por tratamento ácido/ calor nestes sítios foi verificada como sendo ineficaz. As seqüências de proteína que são especialmente lábeis para ácido/ calor foram descritas na literatura, três destas seqüências são WGDPHY (SEQ ID NO:183), DNNDPI (SEQ ID NO:184), e VVADPN (SEQ ID NO:185)(isto é, Ligantes 1, 2 e 3).

Antes destes ligantes lábeis em ácido serem introduzidos no vetor de expressão BCE103-BBI, pJM103BBI, um sítio *Bss*HII foi introduzido por mutagênese QuikChange® XL (Stratagene) (usando os métodos do fabricante; e descritos no exemplo 17 acima, exceto etapas de extensão de 8 minutos e desnaturação de 1 minuto foram usadas), na região de codificação de seqüência de sinal *aprE* usando os iniciadores de oligonucleotídeos BCEbss-F e BCEbss-R (providos acima). Então, sítios *Hind*III e *Xho*I foram inseridos em frente do terminador LAT (após o códon de parada BBI) e um sítio *Pac*I foi adicionado após o terminador (o sítio *Hind*III original após o terminador LAT foi removido) por inserção de um cassete de oligonucleotídeo (BCEterm+ e BCEterm-; provido acima) nos sítios *Sal*I e *Hind*III original. Este novo vetor é chamado "p2JM103BBI."

Os fragmentos de ligante lábil em ácido foram gerados por PCR, usando iniciador dianteiro BCE103coreBssHII_FW com cada um dos iniciadores reversos, ligante WGDPHY_RV (SEQ ID NO:191), ligante DNNDPI_RV (SEQ ID NO:192), ou ligante VVADPN_RV (SEQ ID NO:193) e p2JM103BBI como o gabarito (vide, Exemplo 16, para o protocolo PCR). Os fragmentos PCR de 970 bp foram digeridos com *Bam*HI e *Pst*I, os fragmentos 154 bp codificando os fragmentos do ligante de ácido foram isolados de um gel agarose após eletroforese, e ligados no vetor p2JM103 digeridos com *Bam*HI e *Pst*I que também foram purificados de um gel. As seqüências de ligante nos vetores de expressão finais, p2JM103lnk1-BBI, p2JM103lnk2-BBI e p2JM103lnk3-BBI, foram verificadas por seqüenciamento de DNA.

B. subtilis competente, cepas BG3934comK ou BG6006 foram transformados com os plasmídeos, colônias selecionada em placas de 5

µg/ml cloranfenicol LA e amplificados a 25µg/ml cloranfenicol como descrito no exemplo 16.

5 Similarmente, os ligados lábeis em ácido foram inseridos no primeiro ligante de CBD. Especificamente, os fragmentos de PCR foram gerados usando o iniciador dianteiro BCE103corePstI_FW (SEQ ID NO:194) com os iniciadores reversos LplusWGDPHY_RV (SEQ ID NO:195), LplusDNNDPI_RV (SEQ ID NO:196), ou LplusVVADPN_RV (SEQ ID NO:197) com p2JM103BBI como um gabarito. Os fragmentos de PCR de cerca de 150 bp foram digeridos com *Bam*HI e *Pst*I, purificados e ligados no vetor 10 p2JM103BBI digerido com *Bam*HI e *Pst*I. As seqüências corretas foram verificadas por seqüenciamento de DNA e os plasmídeos p2JM103pIlnk1-BBI, p2JM103pIlnk2-BBI e p2JM103pIlnk3-BBI foram usados para transformar as cepas de *B. subtilis* como descrito acima.

15 Após crescimento em meio MBD, as proteínas de fusão foram purificadas por cromatografia de troca iônica essencialmente como descrito acima (vide, Exemplo 17). A proteína de fusão foi clivada por tratamento a 55°C durante 16 h em 10% ácido fórmico. O domínio catalítico BCE103 precipitado durante o tratamento com ácido foi removido por centrifugação. O BBI livre no sobrenadante foi secado durante a noite em um SpeedVac. A 20 amostra foi colocada em suspensão em 50 mM Tris pH 8 antes de carregar no gel SDS-PAGE. Por análise dos géis SDS-PAGE coloridos com proteína, observou-se que a clivagem com ácido foi bem mais eficiente nas proteínas de fusão onde o Ligante 2 foi inserido entre o domínio catalítico BCE103 e BBI (BCE-DNNDPI-PDP-BBI; SEQ ID NO:199). Este ligante foi verificado 25 como sendo clivado em um par de horas a 75°C em 20 mM glicina pH 2.

Em modalidades alternativas, a proteína de fusão foi clivada por tratamento com uma protease durante o processo de purificação. Ligantes foram projetados com sítios de clivagem para ácido glutâmico, proteases específicas (por exemplo, Mpr ou V8 protease), furina/blisterase, genenase I, 30 e enteropeptidase (enteroquinase). Estes ligantes foram introduzidos como cassetes de oligonucleotídeos (vide *acima*, para as seqüências) entre o núcleo catalítico BCE103 e BBI no vetor de expressão usando os sítios *Bam*HI

e *SacI* (vide, Figura 14). Na região de codificação do vetor de expressão original (pJM103BBI), se tem um resíduo de ácido glutâmico no 1º domínio de CBD e um terceiro resíduo em BBI (vide, Figura 14), que é contemplado para ser susceptível à clivagem por proteases específicas para ácido glutâmico como *B. subtilis* Mpr (BsMpr) ou V8 protease. No entanto, nem BsMpr nem V8 proteases foram verificadas como clivando a proteína de fusão BCE-BBI de modo muito eficaz nestes sítios. Assim, foi necessário projetar outros ligantes que foram susceptíveis à clivagem por estas proteases.

Os seis ligantes lábeis em ácido descritos acima foram testados para clivagem por BsMpr. Estas proteínas de fusão foram clivadas por tratamento durante 16 h com 16 µg de BsMpr à temperatura ambiente. Após clivagem, o domínio catalítico BCE103 foi precipitado pela adição de ácido fórmico a 10 % e removido por centrifugação. O BBI livre no sobrenadante foi secado durante a noite em um SpeedVac. A amostra foi colocada em suspensão em 50 mM Tris pH 8, antes de carga no SDS-PAGE. Similar à clivagem de ácido, a proteína de fusão BCE-DNNDPI-PDP-BBI (Ligante 2; SEQ ID NO:199) foi clivada de modo bem mais eficiente para BsMpr do que para qualquer um dos outros ligantes. Assim, BBI e seus variantes foram verificados como sendo eficazmente liberados da proteína de fusão BCE-DNNDPI-PDP-BBI (SEQ ID NO:199) ou por tratamento ácido/ calor ou digestão proteolítica com uma protease específica para ácido glutâmico, como BsMpr. Vários outros ligantes projetados para clivagem por Mpr (por exemplo, E, ligante E3, e fle, providos acima) foram testados, mas nenhum dos mesmos tinha quaisquer vantagens sobre Ligante 2 (o ligante E3 foi gerado por uma recombinação defeituosa em *E. coli* após transformação com a reação de mutagênese sítio-dirigida QuikChange® projetada para construir o ligante E). Como mostrado acima, existem dois sítios de clivagem lábeis ácido/calor no Ligante 2 e três sítios sensíveis à clivagem por Mpr.

Os ligantes projetados para clivagem por furina ou blisterase (NEB) (BCEfurinBBI), ou enteropeptidase (enteroquinase, NEB) (BCEentBBI) foram testados, mas nenhuma destas seqüências foi clivada de modo eficaz para a protease apropriada. Quatro ligantes foram também projetados

(BCEgenen1BBI, BCEgenen2BBI, BCEgenen3BBI, e BCEgenen4BBI) e testados para clivagem por genenase I (NEB). Clivagem efetiva da proteína de fusão foi observada somente com o ligante de Gen4 (BCEgenen4BBI). BsMpr foi também verificado para clivar de modo eficaz o ligante Gen4.

- 5 Após ativação da proteína de fusão BCE-Ink2-2BBIck81 purificada, a clivagem por BsMpr não chega até completar, como julgado por géis SDS-PAGE. No entanto, foi descoberto que a clivagem completa após ativação de proteínas de fusão BCE-BBI com Ligante 2 (ou o ligante Gen4) pode ser obtida por uso de Mpr protease isolada de *Bacillus licheniformis* (BIMpr).
- 10 Apesar de não se pretender que a presente invenção seja limitada a qualquer mecanismo em particular, a clivagem após o terceiro aminoácido em BBI maduro, parece ser mais sensível a BIMpr enquanto a clivagem após o sexto aminoácido do C-término de BBI é mais sensível à clivagem de BsMpr.

- Em algumas modalidades, após a clivagem, o BBI é purificado
- 15 do domínio catalítico BCE103 por precipitação de ácido seletiva (pH 3 ou menor) do domínio catalítico BCE103, como descrito acima, cromatografia de troca iônica (vide, Exemplo 20), ou por ligação seletiva de BBI em uma coluna de anidrotipsina -agarose (Sigma) carregada em 50 mM Tris pH 8,0, lavada com 50 mM Tris pH 8,0 com 150 mM NaCl, então eluindo BBI ligado
- 20 com 50 mM glicina pH 2,2 com 300 mM NaCl).

EXEMPLO 20

Ligação de BBIck81 em VegF

- Neste Exemplo, experimentos conduzidos para avaliar a ligação de BBIck81 em VegF são descritos. A proteína de fusão BCE103-Ink2-2BBIck81 foi produzida em *B. subtilis* como descrito em exemplo 17. A proteína de fusão foi purificada, e a atividade inibidora de tripsina BBI foi aumentada por tratamento com β ME e glutathione oxidada, como descrito em exemplo 18. A proteína de fusão foi clivada por BsMpr protease (vide, Exemplo 19) e o 2BBIck81 livre foi purificado do domínio catalítico BCE103 por
- 25 cromatografia de troca iônica usando uma coluna Q-Sepharose.
- 30 Brevemente, após clivagem, o pH da amostra clivada foi ajustado a 5,5, a amostra foi então carregada sobre a coluna (equilibrada com 25

mM MES pH 5,5). O 2BBIck81 livre foi lavado através da coluna usando 25 mM acetato de sódio pH 5,0, enquanto o núcleo catalítico de BCE103 permaneceu ligado à resina. A fração de 2BBIck81 foi concentrada por ultrafiltração e analisada usando um teste de ligação à base de eletroquimioluminescência (ECL) (BioVeris). Os anticorpos anti-VegF (Santa Cruz) e VegF (PeproTech) foram rotulados com o corante de eletroquimioluminescência e biotina, respectivamente, como descrito pelo fabricante (BioVeris). Todos os materiais eram PBS de Dulbecco (Mediatech) suplementados com 0,1 % TWEEEN®-80. Uma série de diluição inicial de anticorpo anti-VegF (125, 250 e 500 ng/ml) e VegF (100, 150, 200 e 250 ng/ml) foi testada no teste de ligação para determinar as concentrações de cada que iriam dar um sinal ECL robusto.

Para testar a ligação de 2BBIck81, 50 µL de 500 ng/ml anticorpo anti-VegF rotulado com ECL, 50 µL de 250 ng/ml VegF biotinilado e 100 µL 2BBIck81 (série de 12,5, 15, 31,25, 62,5, 125, 250 ou 500 ng/ml) foram incubados em temperatura ambiente durante 2 h com agitação. Então, 50 µL de 0,2 mg/ml de contas revestidas com estreptavidina foram adicionadas e a reação foi incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. O sinal de ECL foi medido usando um analisador BioVeris M8/384 como descrito pelo fabricante (BioVeris). Como mostrado em Figura 19, o sinal ECL diminuiu como as concentrações crescentes de 2BBIck81 deslocaram mais do anticorpo anti-VegF rotulado ligado a VegF fixado nas contas magnéticas.

Assim, o peptídeo CK37281 quando enxertado sobre o laço inibidor de quimotripsina de BBI (2BBIck81) competiu com o anticorpo anti-VegF para ligação a VegF em concentrações micromolares. De fato, 2BBIck81 competiu para a ligação de VegF bem melhor do que o próprio peptídeo CK37281 sintetizado (vide, Figura 19). O peptídeo CK37281 inserido no laço inibidor de tripsina, 1BBIck81, também competiu com o anticorpo anti-VegF no teste BioVeris. Assim, BBI foi verificado como sendo utilizável como parte de um esqueleto para apresentar peptídeos de ligação ativos selecionados por vários métodos de triagem.

EXEMPLO 21Uso de Parceiros de Fusão Alternativos para a Produção de 2BBIck81

Neste Exemplo, experimentos conduzidos para avaliar parceiros de fusão alternativos são descritos. A seqüência de DNA dos iniciadores de oligonucleotídeos usados para amplificar o gene *dsbC* (*E. coli*) de pET-40b(+) é dada abaixo. Estes iniciadores geram um sítio *Bss*HI na extremidade 5' e um *Bam*HI na extremidade 3' para clonagem em p2JM103-Gen4-2BBIck81.

DsbCBBI-F

10 AACATGAGCGCGCAGGCTGATGACGCGGCAATTCAACAAACGTTAG
(SEQ ID NO:223)

DsbCBBI-R

TCGTCTGGATCCGGTATGGGATCATTGTTGTCACCAGAACCACTAGTTG
ATCCTTTACCGCTGGTCATTTTTTGGTG (SEQ ID NO:224)

15 As seqüências de DNA dos oligonucleotídeos que foram anelados juntos para fazer um cassete (*Alw*44I-*Bam*HI) para fusão do gene cutinase de *P. mendocina* em BBI com Ligante 2, são dadas abaixo.

CutinaseBBI+

TGCACTTCTCTGCTTTGGTCTGTTGAACGCAGAGGTCTTGACAACAATG
20 ATCCTATTCCG (SEQ ID NO:225)

CutinaseBBI-

GATCCGGAATAGGATCATTGTTGTCAAGACCTCTGCGTTCAACAGACCA
AAGCAGAGAAG (SEQ ID NO:226)

25 Devido à porção de BBI ter sete ligações dissulfeto, contempla-se que títulos maiores de BBI ativo seriam obtidos usando proteínas de fusão diferentes das do domínio catalítico de BCE103 celulase. For exemplo, em algumas modalidades, composições como tiol-dissulfeto oxidoreductases e/ou proteína dissulfeto isomerases encontram uso como proteínas de fusão para ajudar a produzir porções de BBI corretamente duplicadas. Nesta modalidade, não é necessária nenhuma etapa de ativação adicionado sob a
30 maior parte das circunstâncias. Em modalidades adicionais, outras proteínas produzidas em títulos elevados em *B. subtilis* também encontra uso como

parceiros de fusão. Por exemplo, a proteína termoestável dissulfeto isomerase do fungo *Humicola insolens* (hiPDI) foi usada como um parceiro de fusão para produzir a cadeia leve de imunoglobulina G (2 dissulfetos) em *Bacillus brevis* (vide, Kajino *et al.*, Appl. Env. Microbiol., 66:638-642 [2000]).

5 Para determinar se hiPDI pode ser um melhor parceiro de fusão do que BCE103 para a produção de BBI, este gene hiPDI foi sintetizado (DNA2,0) e clonado no vetor de expressão, p2JM103-Ink2-2BB1ck81 (vide, Exemplo 19) como um fragmento *Bss*HII- *Sac*I. Ao projetar o gene sintético, códon ocorrendo com elevada frequência em genes de *B. subtilis* altamente expressados foram selecionados exceto em casos onde os sítios de restrição foram introduzidos ou deletados. Na constructo final, o N-término do gene hiPDI maduro foi fundido na sequência de sinal AprE e o C-término foi fundido a um ligante com um sítio de clivagem de Enteropeptidase (Kajino *et al.*, Appl. Env. Microbiol., 66:638-642 [2000]), que, por sua vez, foi fundido a 2BB1ck81 (vide, Figura 20). Este vetor de expressão, p2JM-PDI-EK-2BB1ck81, foi usado para transformar *B. subtilis* BG6006 e a produção da proteína de fusão foi determinada em meio MBD (como descrito no exemplo 16) com ou sem 2 mM β ME adicionado 14 h após inoculação.

20 Como determinado por géis SDS-PAGE, a produção da proteína de fusão PDI-2BB1ck81 foi tipicamente um pouco menor do que a de BCE-2BB1ck81 cultivada sob condições idênticas. Os títulos de BBI (inibição de tripsina) medidos dos sobrenadantes isentos de células PDI-2BB1ck81 foram também tipicamente menores do que a fusão BCE-2BB1ck81. Como com as fusões a BCE103, as atividades medidas de BBI quando fundido a PDI foram maiores quando cultivado em 2 mM β ME e a atividade de BBI foi aumentada pela adição de β ME aos sobrenadantes isentos de células após o crescimento quando cultivados em meio isento de β ME (como descrito em exemplo 18). Assim, a atividade de tiol-dissulfeto oxidoreductase de PDI não parece aumentar significativamente os títulos de 2BB1ck81 ativo na proteína de fusão ou eliminar a necessidade para a ativação da molécula de BBI.

30 A fim de aumentar a redução em potencial da proteína de fusão, que foi contemplada para melhorar os títulos de BBI durante o crescimento,

DsbC de *Escherichia coli* foi usado como um parceiro de fusão para 2BBIck81. O gene *dsbC* foi amplificado por PCR usando Herculase Enhanced DNA polymerase como descrito pelo fabricante (Stratagene) usando DsbCBBI-F e DsbCBBI-R como iniciadores (seqüências mostradas acima) e pET-40b(+) (Novagen) como um gabarito. O fragmento de PCR isolado foi clonado no vetor p2JM103-Gen4-2BBIck81 (vide, Exemplo 19) como um fragmento *BssHII-BamHI*. A seqüência correta do gene de fusão foi verificada por seqüenciamento de DNA. Neste caso, os títulos da proteína de fusão DsbC-2BBIck81 foram significativamente menores do que da proteína de fusão BCE-2BBIck81 como julgado em géis SDS-PAGE e os títulos do 2BBIck81 ativo medidos por inibição de tripsina foram também bem menores.

Outras proteínas que são produzidas em títulos elevados em *B. subtilis* encontram uso como parceiros de fusão para a produção de BBI. Uma tal proteína é a cutinase de *Pseudomonas mendocina*, que foi expressada em títulos elevados utilizando o promotor *aprE* de *B. subtilis* (ver por exemplo, Pat. U.S. Nº 5.429.950, incorporado aqui por referência). A fusão do gene *aprE*-cutinase como um fragmento *EcoRI-Alw44I* (de pAK-15) foi ligada com cassete de oligonucleotídeo de ligante *Alw44I-BamHI* (vide, seqüência acima) no p2JM103-Ink2-2BBIck81 (vide, Exemplo 19) que foi cortado com *EcoRI* e *BamHI*. Este vetor de expressão cutinase-ligante 2-2BBIck81 (vide, Figura 21 para a seqüência *EcoRI-BamHI aprE*-cutinase-ligante 2) foi usado para transformar as células de *B. subtilis* BG6006 e a proteína de fusão foi produzida em meio MBD como descrito previamente para as outras proteínas de fusão (vide, Exemplo 16). Neste caso, a proteína de fusão cutinase-ligante 2-2BBIck81 não foi a banda principal observada em géis SDS-PAGE e os títulos de lipase medidos (como medidos usando os métodos providos em patente US 5 429 950) e os títulos de BBI foram bem menores (cerca de 20 vezes) do que o encontrado com a proteína de fusão BCE-2BBIck81. Também os títulos de BBI na proteína de fusão cutinase não foram melhorados de modo significativo quando 3 mM β ME foi adicionado ao meio de crescimento. Assim, os maiores títulos de 2BBIck81 ati-

vo foram consistentemente obtidos por ativação da proteína de fusão BCE-2BBlck81. Mesmo assim, é contemplado que vários parceiros de fusão irão encontrar uso na presente invenção.

Os versados na técnica irão prontamente notar que a presente invenção é bem adaptada para realizar os objetos e obter as finalidades e vantagens mencionadas, assim como as inerentes aqui. Os complexos moleculares e os métodos, procedimentos, tratamentos, moléculas, compostos específicos descritos aqui são atualmente representativos de modalidades preferidas, são exemplares, e não são destinados a serem uma limitação no escopo da invenção. Será prontamente evidente para os versados na técnica que substituições e modificações variadas podem ser feitas na invenção descrita aqui sem sair do escopo e espírito da invenção.

Todas as patentes e publicações mencionados no relatório são indicativas dos níveis dos versados na técnica à qual a invenção pertence. Todas as patentes e publicações são aqui incorporadas por referência na mesma extensão como se cada publicação individual fosse especificamente e individualmente iniciada a ser incorporada por referência.

A invenção aqui descrita de modo ilustrativo pode ser praticada de modo apropriado na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações que não são especificamente aqui descritas. Os termos e expressões que foram empregados são usados como termos de descrição e não limitação, e não se tem intenção que no uso destes termos e expressões excluir quaisquer equivalentes dos aspectos mostrados e descritos ou suas porções, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção. Assim, deve-se entender que apesar da presente invenção ter sido especificamente descrita pelas modalidades preferidas e aspectos opcionais, modificação e variação dos conceitos aqui descritos podem ser obtidas pelo versado na técnica, e que estas modificações e variações são consideradas como dentro o escopo da invenção, como aqui definido.

A invenção foi descrita amplamente e genericamente aqui. Cada uma das espécies e agrupamentos subgenéricos mais limitados, dentro da

descrição genérica, também formam parte da invenção. Isto inclui a descrição genérica da invenção com uma condição ou limitação negativa removendo qualquer assunto do gênero, sem levar em conta se ou não o material retirado é especificamente aqui descrito.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de cuidado pessoal compreendendo um suporte de esqueleto, em que o referido esqueleto compreende um inibidor de protease e pelo menos um peptídeo selecionado dentre o grupo consistindo em
5 SEQ ID NOS:1-17.

2. Composição de cuidado pessoal de acordo com a reivindicação 1, em que o referido inibidor de protease é selecionado dentre o grupo consistindo em inibidor de Bowman-Birk, inibidor de tripsina de soja, e inibidor de quimotripsina Elgin.

10 3. Composição de cuidado pessoal de acordo com a reivindicação 2, em que o referido inibidor de Bowman-Birk é um inibidor modificado de Bowman-Birk.

4. Composição de cuidado pessoal de acordo com a reivindicação 1, em que o referido suporte de esqueleto compreende de cerca de
15 0,001 por cento em peso, a cerca de 5 por cento em peso da referida composição de cuidado pessoal.

5. Composição de cuidado pessoal de acordo com a reivindicação 4, em que o referido suporte de esqueleto compreende de cerca de 0,01 por cento em peso, a cerca de 2,0 por cento em peso da referida composição de cuidado pessoal.
20

6. Composição de cuidado pessoal de acordo com a reivindicação 5, em que o referido suporte de esqueleto compreende de cerca de 0,01 por cento em peso a cerca de 1 por cento em peso da referida composição de cuidado pessoal.

25 7. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a referida composição de cuidado pessoal é uma composição de cuidado da pele selecionada dentre o grupo consistindo em cremes, loções, pulverizações, emulsões, suspensões coloidais, espumas, aerossóis, líquidos, géis, soros, e sólidos para a pele.

30 8. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que a referida composição de cuidado pessoal é uma composição de cuidado da pele selecionada dentre líquidos umectantes de limpeza corporal, líquidos de lim-

peza corporal, limpadores antimicrobianos, cremes protetores da pele, loções corporais, cremes faciais, cremes umectantes, emulsões de limpeza facial, géis faciais, soros faciais, limpadores faciais à base de tensoativos, géis esfoliantes faciais, tratamentos antiacne, tonalizantes faciais, cremes
5 esfoliantes, máscaras faciais, bálsamos pós-barba, bálsamos pré-barba, composições de bronzamento, composições de clareamento da pele, composições redutoras de vermelhidão da pele, filtros solares, depilatórios, inibidores do crescimento de cabelo, e radioprotetores.

9. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que a referida
10 composição de cuidado da pele compreende composições aplicadas topicamente, de venda direta, tratamentos antifungos, tratamentos antiacne, protetores da pele, filtros solares, desodorantes, e antiperspirantes.

10. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que referida composição é capaz de clarear a tonalidade da pele.

11. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que a referida
15 composição é capaz de reduzir a vermelhidão na tonalidade da pele.

12. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que a referida composição é capaz de evitar o escurecimento da tonalidade da pele.

13. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que a referida
20 composição é capaz de evitar o desenvolvimento da cor da pele.

14. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que referida composição de cuidado da pele é um radioprotetor.

15. Composição de acordo com a reivindicação 14, em que o referido radioprotetor é um filtro solar selecionado dentre filtros solares não
25 resistentes à água, filtros solares muito resistentes à água, e filtros solares água-em-silicone.

16. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a referida composição de cuidado pessoal é capaz de evitar o crescimento de cabelo.

17. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a referida
30 composição de cuidado pessoal é uma composição de cuidado do cabelo.

18. Composição de cuidado do cabelo de acordo com a reivindicação 17, em que a referida composição de cuidado do cabelo é selecionada dentre o grupo consistindo em xampus, condicionadores, composições para pentear o cabelo, colorantes para cabelo, formulações de ondas permanentes, cremes, géis, espumas, pulverizações, emulsões, suspensões coloidais, líquidos, espumas, e sólidos.

19. Composição de cuidado do cabelo de acordo com a reivindicação 18, em que a referida composição de cuidado do cabelo ainda compreende um radioprotetor.

20. Composição de acordo com a reivindicação 19, em que o referido radioprotetor é um filtro solar selecionado dentre filtros solares não resistentes à água, filtros solares muito resistentes à água, e filtros solares água-em-silicone.

21. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a referida composição de cuidado pessoal é uma composição de cuidado oral.

22. Composição de acordo com a reivindicação 21, em que a referida composição de cuidado oral é selecionada dentre o grupo consistindo em pastas de dentes, géis de dentes, colutórios, líquidos para limpeza oral, composições anticáries, composições de branqueamento dos dentes, gomas de mascar, adesivos para dentaduras, e refrescantes bucais.

23. Composição de acordo com a reivindicação 1, em que a referida composição de cuidado pessoal é uma composição cosmética.

24. Composição de acordo com a reivindicação 23, em que a referida composição cosmética é selecionada dentre géis para os olhos, sombras para os olhos, batons de ponto de derretimento elevado, batons, brilhos para os lábios, bálsamos para os lábios, rímel, lápis para os olhos, formulações de pó compacto, e bases.

25. Composição de acordo com a reivindicação 24, em que a referida composição de maquiagem compreende pelo menos um pigmento.

26. Composição de acordo com a reivindicação 25, em que a referida composição de maquiagem compreendendo pelo menos um pigmento é um rímel selecionada dentre rímel não à prova d'água, rímel à prova

d'água, rímel avolumador, rímel extensor, rímel enrolador, rímel anidro à prova d'água, rímel à base d'água, e tratamentos dos cílios e sobrancelhas.

27. Composição de acordo com a reivindicação 25, em que a referida composição de maquiagem é uma formulação de pó compacto selecionada dentre pós soltos, *blushes*, sombras para os olhos, e pós de bronzeamento.

28. Composição de acordo com a reivindicação 25, em que a referida composição de maquiagem é uma base selecionada dentre base água-em-óleo, base água-em-silicone, bases óleo-em-água, bastões anidros para maquiagem, e bases creme-a-pó.

29. Composição de cuidado pessoal de acordo com a reivindicação 1, em que o referido suporte de esqueletocompreende a seqüência de aminoácidos especificada em SEQ ID NO:19.

30. Composição de cuidado pessoal de acordo com a reivindicação 1, em que o referido esqueletoainda compreende pelo menos uma seqüência de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21.

31. Composição de cuidado pessoal de acordo com a reivindicação 30, em que pelo menos uma das referidas seqüências de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS: 20 e 21 é substituída por pelo menos um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17.

32. Composição de cuidado pessoal de acordo com a reivindicação 1, em que o referido suporte de esqueletocompreende uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25.

33. Método para fabricar a composição de cuidado pessoal como definida na reivindicação 1, compreendendo combinar uma quantidade efetiva do referido esqueletoe pelo menos um veículo ou excipiente fisiologicamente aceitável.

34. Método para modificar a tonalidade da pele de um indivíduo, compreendendo as etapas de:

i) prover uma composição compreendendo a composi-

ção de cuidado pessoal como definida na reivindicação 1;

ii) prover um indivíduo a ser tratado; e

ii) aplicar a referida composição ao referido indivíduo em uma área em que modificações na tonalidade da pele do referido indivíduo são desejadas.

35. Método de acordo com a reivindicação 34, em que a referida modificação de tonalidade da pele compreende o clareamento da tonalidade da pele do referido indivíduo.

36. Método de acordo com a reivindicação 34, em que a referida modificação de tonalidade da pele compreende redutores de vermelhidão na tonalidade da pele do referido indivíduo.

37. Método de acordo com a reivindicação 34, em que a referida composição de cuidado pessoal compreende a seqüência de aminoácidos especificada em SEQ ID NO:19.

38. Método de acordo com a reivindicação 34, em que a referida composição de cuidado pessoal compreende pelo menos uma seqüência de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21.

39. Método de acordo com a reivindicação 34, em que pelo menos uma das referidas seqüências de aminoácidos especificadas em SEQ ID NOS:20 e 21 é substituída por pelo menos um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17.

40. Método de acordo com a reivindicação 34, em que referida composição de cuidado pessoal é codificada por uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25.

41. Método para modificar o crescimento de cabelo de um indivíduo, compreendendo as etapas de:

i) prover a composição de cuidado pessoal de acordo com a reivindicação 1;

ii) prover um indivíduo a ser tratado; e

ii) aplicar a referida composição ao referido indivíduo em uma área em que as modificações ao referido crescimento de cabelo do in-

divíduo são desejadas.

42. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a referida modificação de crescimento de cabelo compreende inibir o crescimento do cabelo do referido indivíduo.

5 43. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a referida modificação de crescimento de cabelo compreende inibir o crescimento do cabelo do referido indivíduo, em que referido cabelo a ser inibido é selecionado dentre o grupo consistindo em cabelo facial, pêlos das axilas, pêlos das pernas, pêlos do torso, e pêlos do braço, e cabelo da cabeça.

10 44. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a referida composição de cuidado pessoal compreende uma seqüência de aminoácidos especificada em SEQ ID NO:19.

15 45. Método de acordo com a reivindicação 41, em que a referida composição de cuidado pessoal compreende pelo menos uma seqüência de aminoácidos especificada em SEQ ID NOS:20 e 21.

20 46. Método de acordo com a reivindicação 45, em que pelo menos uma das referidas seqüências de aminoácidos especificadas em SEQ ID NOS:20 e 21 é substituída por pelo menos um peptídeo tendo uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:1-17.

47. Método de acordo com a reivindicação 38, em que a referida composição de cuidado pessoal é codificada por uma seqüência de aminoácidos selecionada dentre o grupo consistindo em SEQ ID NOS:22-25.

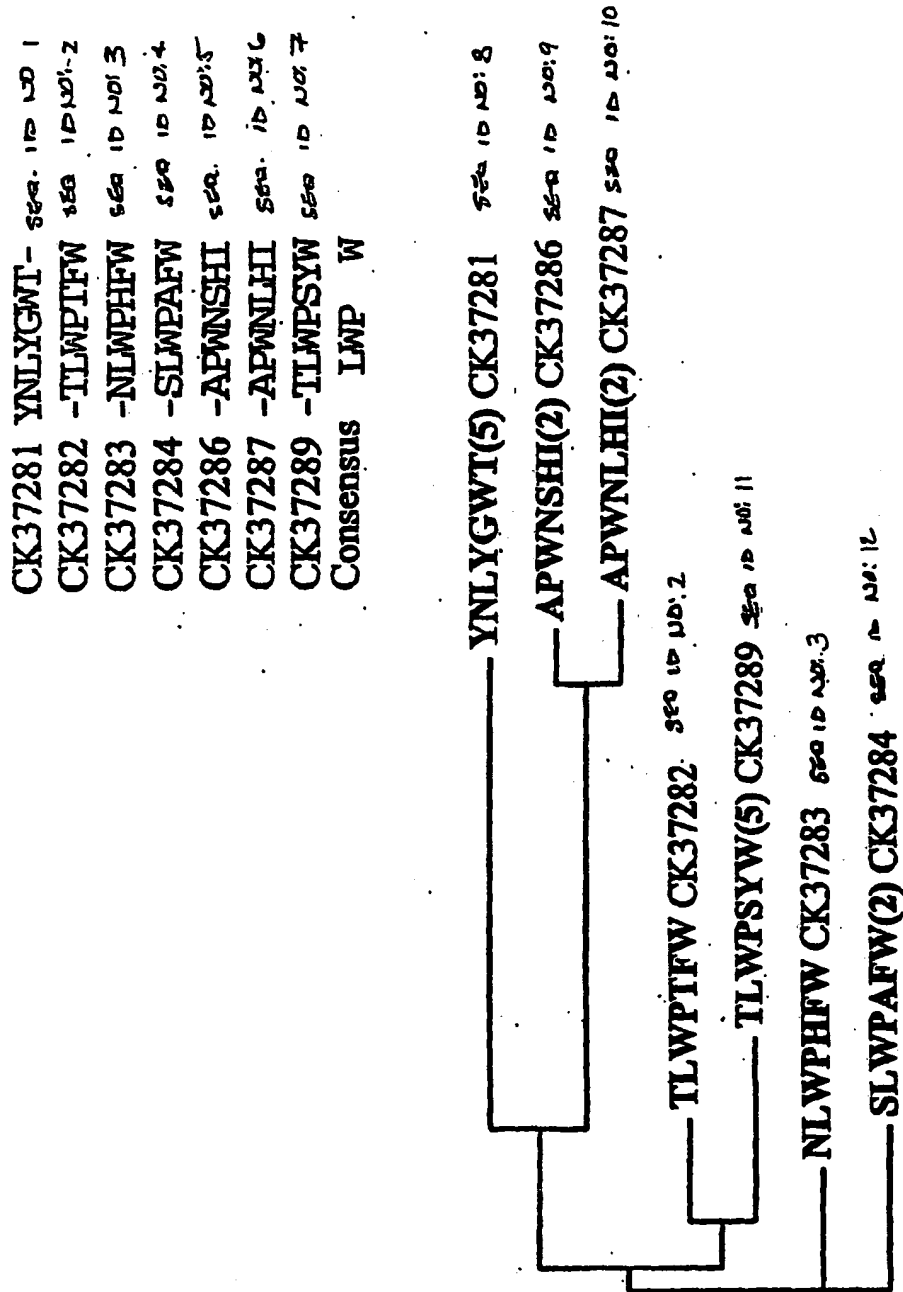


FIG 1

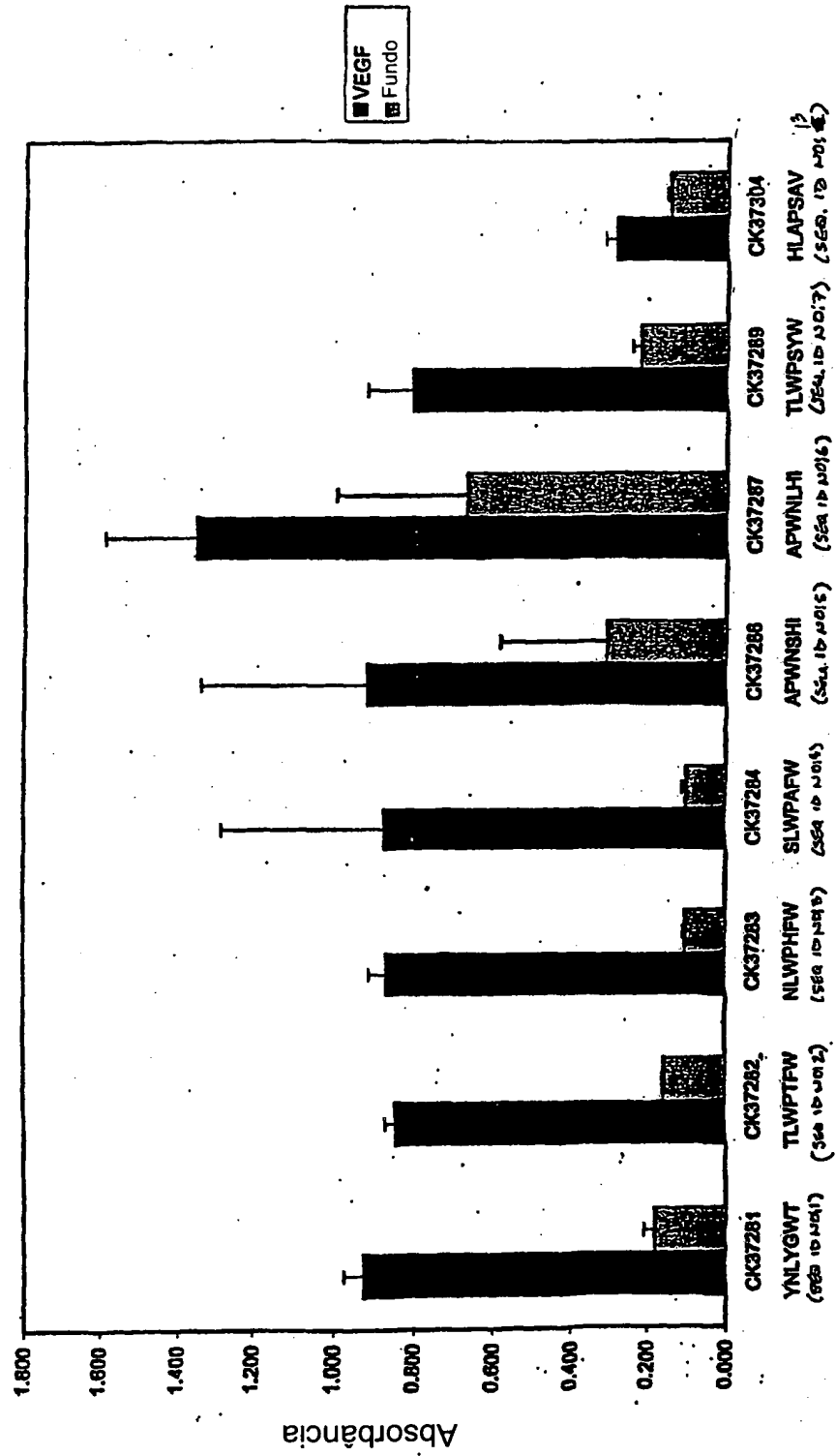
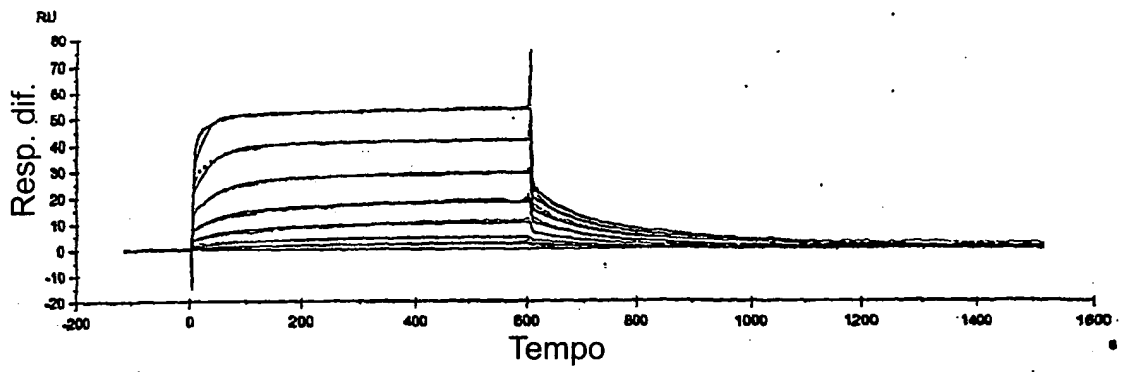


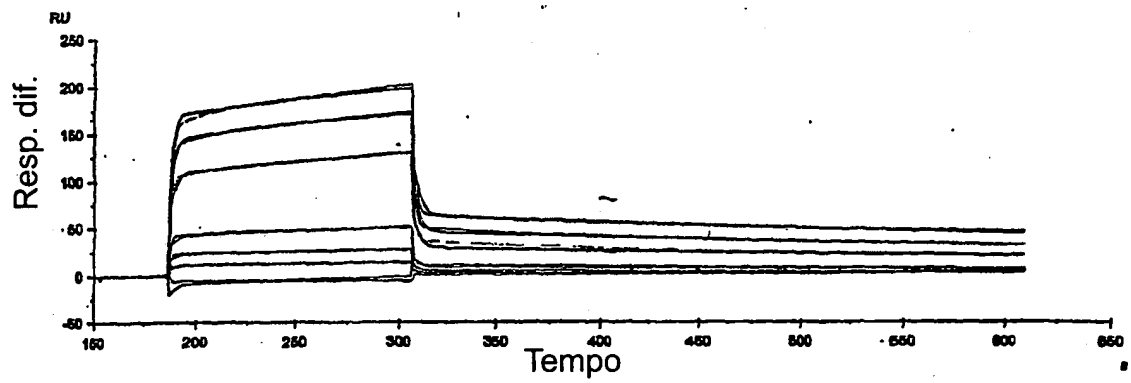
FIG 2

3/27

(A)



(B)



(C)

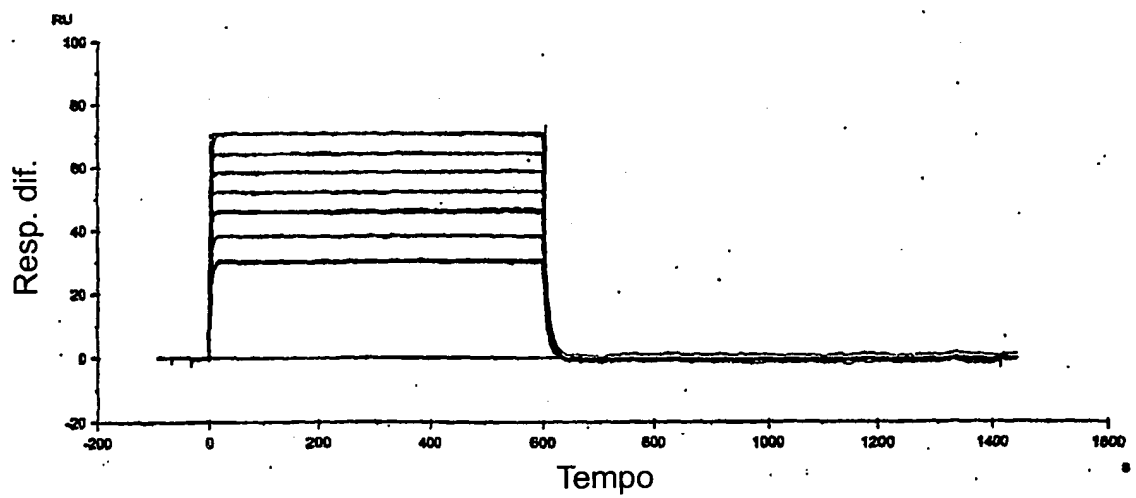


FIG 3

4/27

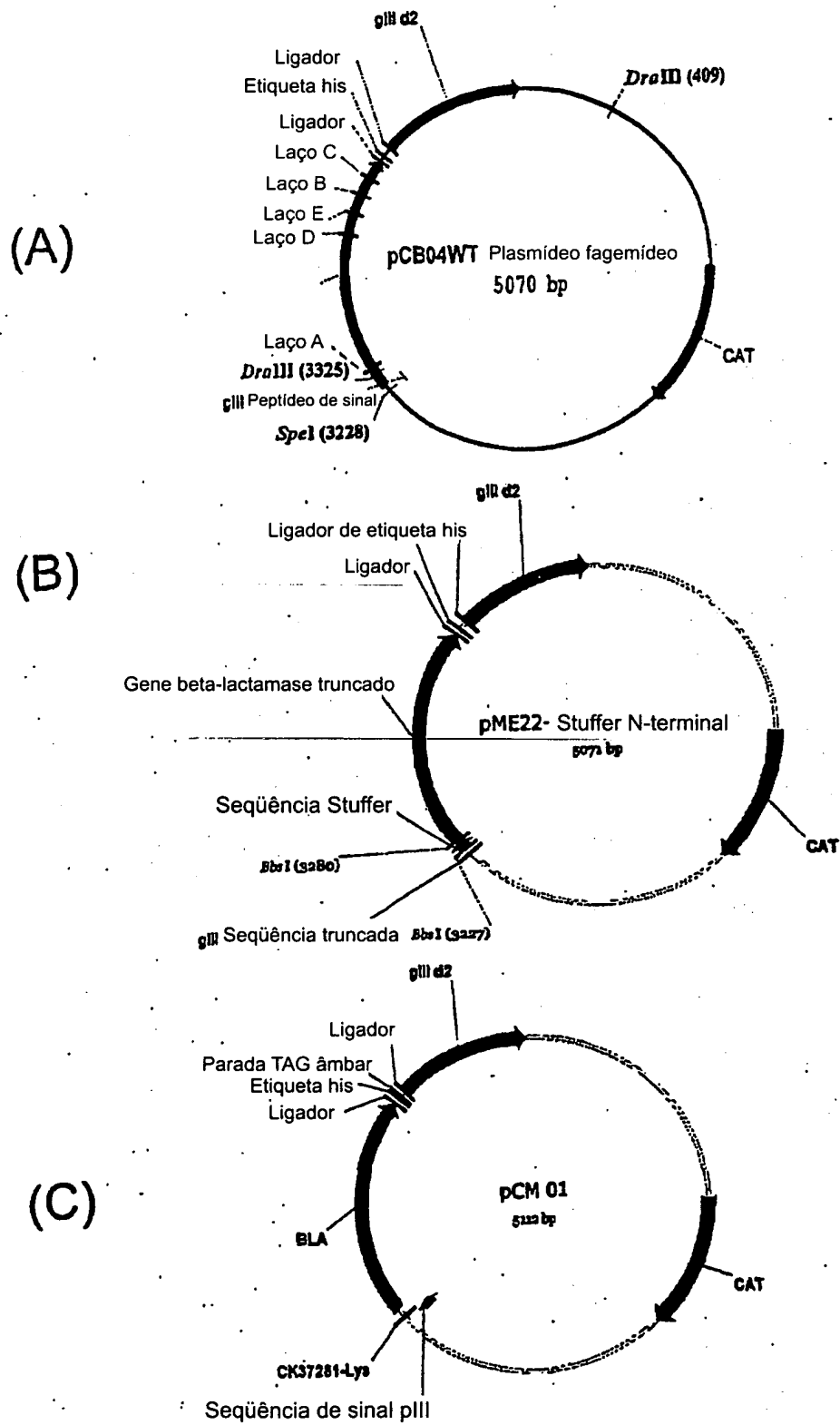


FIG 4

FIG 5

Seqüência AmpC – líder pIII

SpecI DrillI

Digerir com Spel e Dralll (nota: segundo sítio Dralll em vetor)

[illegible]

Substituir com fragmento Stuffer

[illegible]

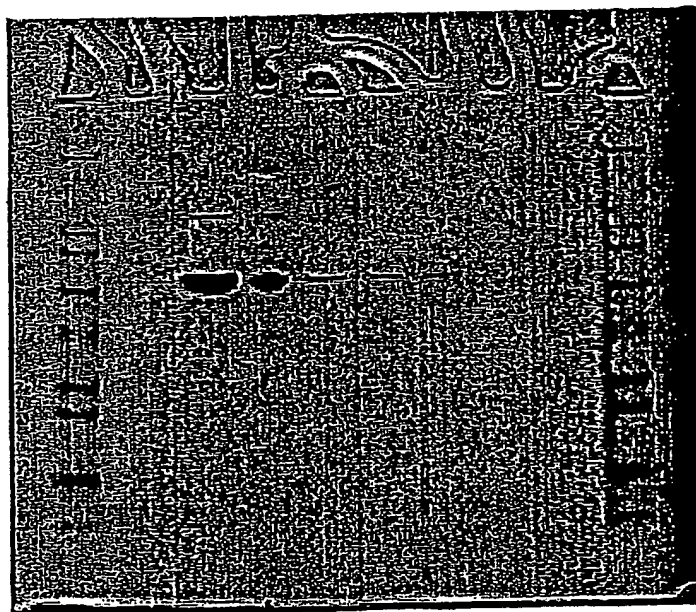
Digerir fragmento stuffer com Bbsl

Hlepra	SspI	Sall	PstI	BbsI	BssHII
(restriction sites are indicated by bold letters)					
ATTC	ACTAGTGTCTTCGATCGACACAGCCTCTCTCCGATGCTTAAGTTG				GCGAGAGTGTCGGCATGACATTACCCTGCTATGAACGACGAGGTCCA
TAAAGTAG	CACAGACGCTAGTTCAGCTCTGTGCACAGCTATGAGCTATTCTGACGCC				TCCACGAGCCTTATCTGCTAATGGGGCTACTTCTGTCTGCACAGGT
	BbsI				
(restriction sites are indicated by bold letters)					
					AlaGluValValAlaMetThrTrpProLeuMetIleAlaSerValPro (Gen. Bank#295)

Sequência AmpC – líder pIII (VegF)

[illegible]

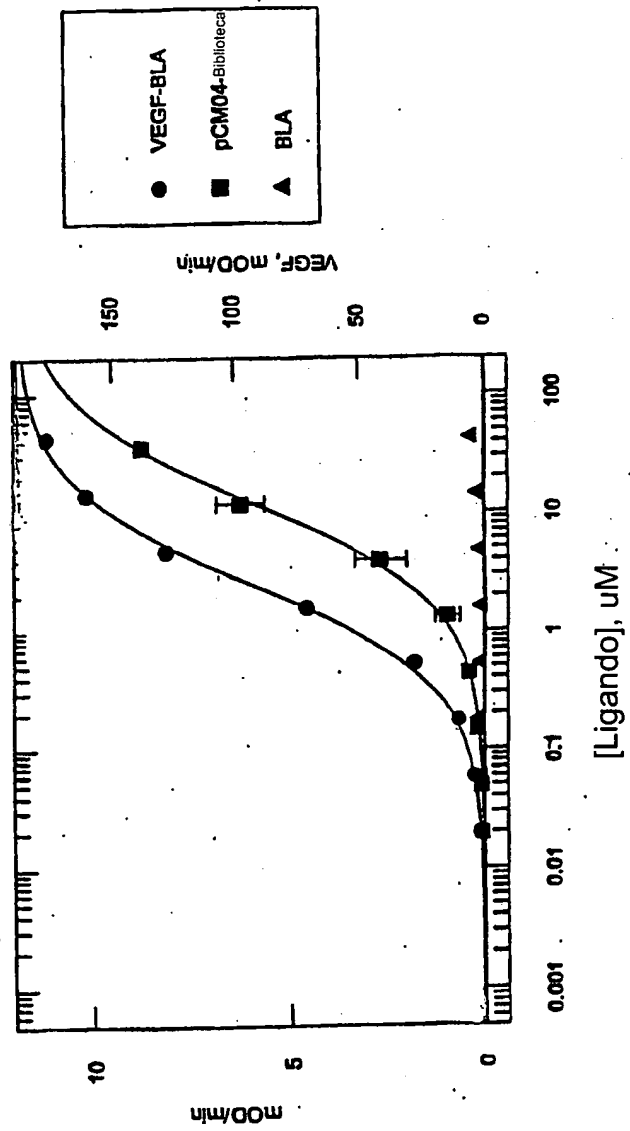
FIG 6



SeeBlue
TOP10/pCD04
TOP10/pCM01 fl 1/8
TOP10/pCM01 fl 1/2
TOP10/pCM01 f3 1/4
TOP10/pCM01 f3 1/6
TOP10/pCM02 1/8
TOP10/pCM02 1/2

SeeBlue

FIG 7



8/27

FIG 8

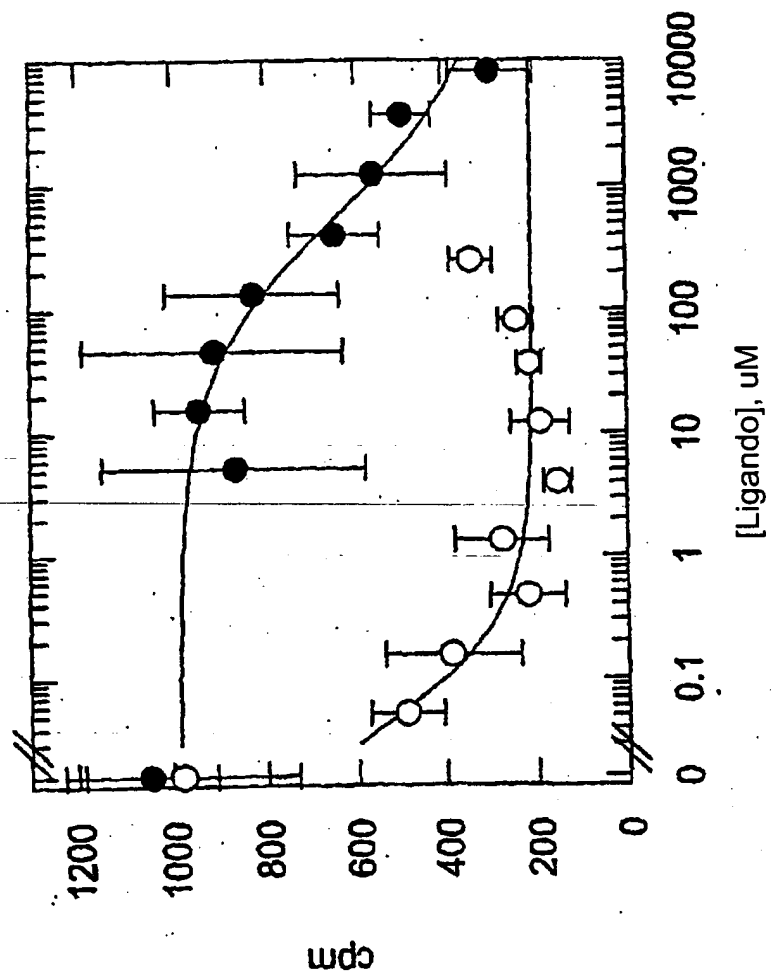


FIG 9

		HindIII																					
NcoI	M	G	A	N	L	R	L	S	K	L	G	L	L	M	K	S	D	H	Q	H	S	N	D
	CCATGGGTGC GAACCTGCCG CTGTCTAAGC TTGGCCTGCT TATGAATCA GACCATCAG C ACAGCAATGA																						
		BsrGI																PstI					
SacI	D	E	S	S	K	P	C	C	D	Q	C	A	C T K S N P P Q C						R	C			
	CGATGAGAGC TCTAAACCCT GTTGGCATCA ATGGCGATGT ACAAATCAA ATCTCCAC A GTGTGGGTGT																						
		SphI																					
EcoRI	S	D	M	R	L	N	S	C	H	S	A	C	K	S	C	I	C A L S Y P A Q						
	TCCGATATGC GTCIGAATTC CTGTCATAGT GCATGCAAAA GCTGTATCTG CGCCCTGAG T TATCCAGCTC																						
		Sali																					
	C	F	C	V	D	I	T	D	F	C	Y	E	P	C	K	P	S	E	D	D	K	E	N
	AATGTTTTTG CGTCGACATC ACGGACTTCT GCTATGAGCC ATGTAAACCA AGCGAGGAC G ATAAAGAGAA																						
		XhoI																					
	H	H	H	H	H	H	H	*	(Seq 12, 13, 16)														
	CCATCATCAC CATCACCATT AACTCGAG (Seq 10, 14, 19)																						

10/27

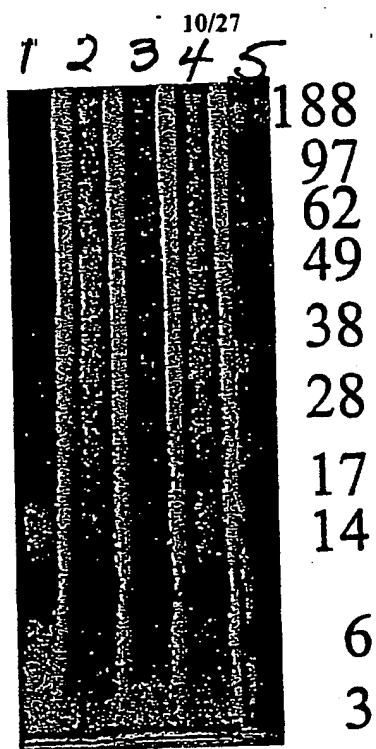


FIG 10

11/27

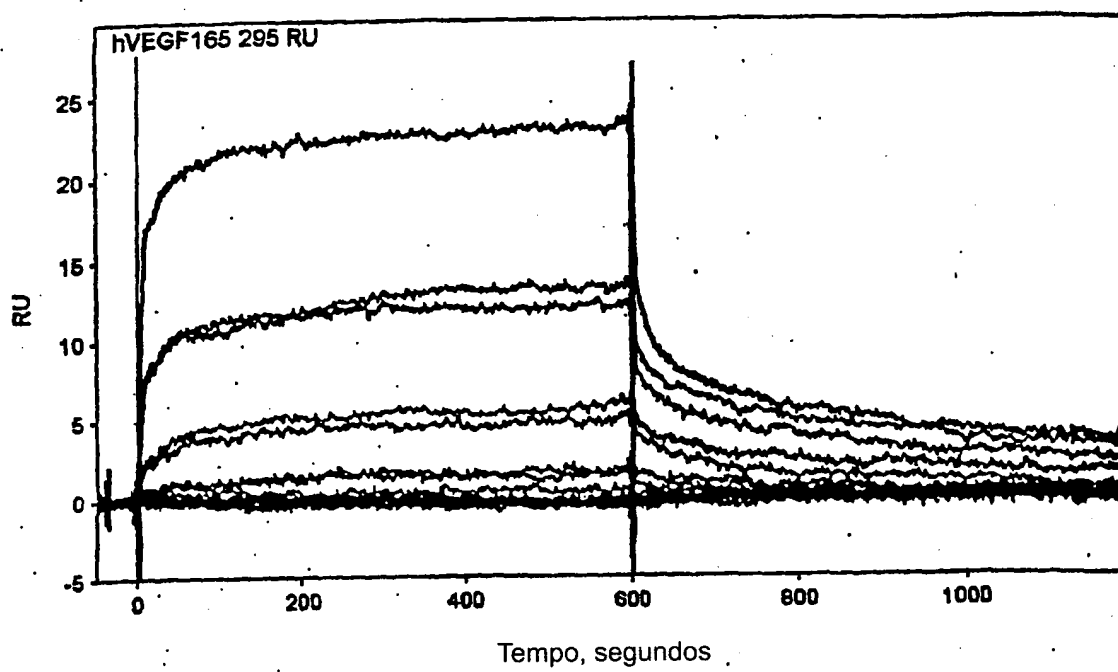


FIG 11

12/27

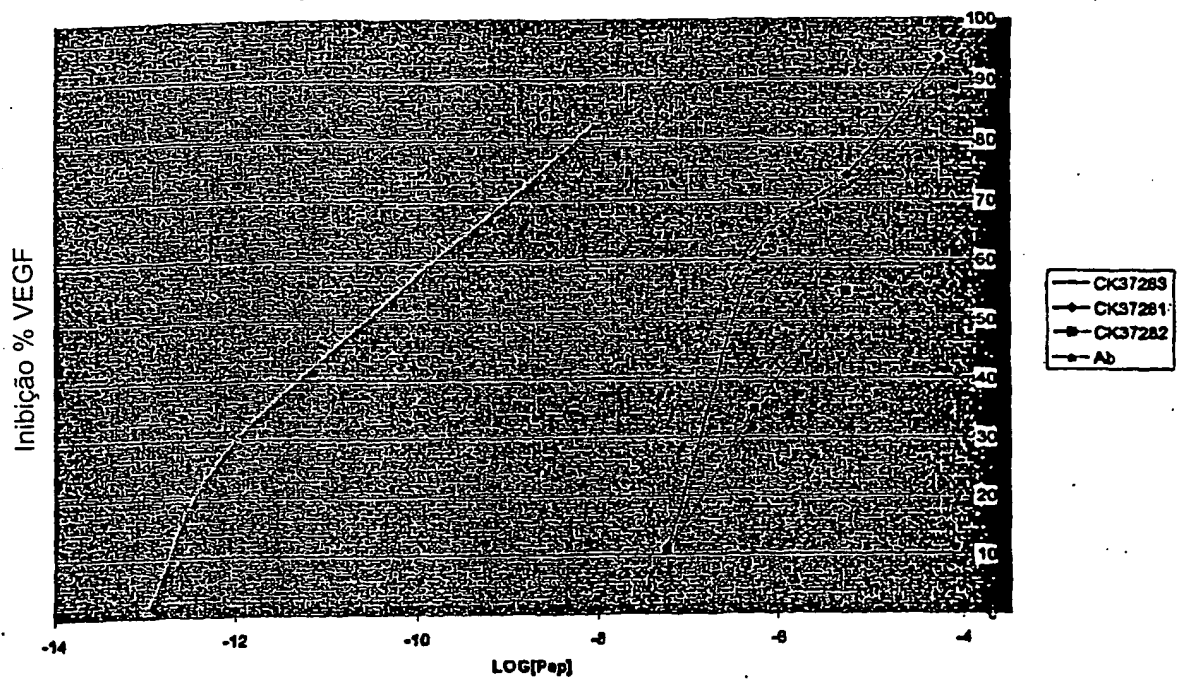


FIG 12

FIG 13

BBI-VEG1: ddesskpoodqcacynlygwtrcsdmrlnschsacksalcalsypaqcfvdlldfcyepckpseddken (360 10 MD:22)
BBI-VEGF2: ddesskpoodqcaciksnppqcrsdmrlnschsacksacacynlygwtrcsdlldfcyepckpseddken (360 10 MD:23)
BBI-VEGF12: ddesskpoodqcacynlygwtrcsdmrlnschsacksacacynlygwtrcsdlldfcyepckpseddken (360 10 MD:24)

Região de promotor *aprE*

EcoRI

1 AATTCTCCAT TTTCTTCTGC TATCAAAATA ACAGACTCGT GATTTTCCAA

Região de promotor *aprE*

51 ACGAGCTTTC AAAAAGCCT CTGCCCCCTG CAAATCGGAT GCCTGTCTAT

Região de promotor *aprE*

EagI

NotI

101 AAAATTCCCG ATATTGGTTA AACAGCGGCG CAATGGCGGC CGCATCTGAT

Região de promotor *aprE*

151 GTCITTGCTT GGCGAATGTT CATCTTATTT CTTCCTCCCT CTCATAATT

Região de promotor *aprE*

201 TTTTCATTCT ATCCCTTTTC TGTAAGTTT ATTTTTCAGA ATACTTTTAT

Região de promotor *aprE*

251 CATCATGCTT TGAAAAATA TCACGATAAT ATCCATTGTT CTCACGGAAG

Região de promotor *aprE*

301 CACACGCAGG TCATTTGAAC GAATTTTTTC GACAGGAATT TGCCGGGACT

Região de promotor *aprE*

351 CAGGAGCATT TAACCTAAAA AAGCATGACA TTTCAGCATA ATGAACATTT

Região de promotor *aprE*

401 ACTCATGTCT ATTTTCGTTC TTTTCTGTAT GAAAATAGTT ATTTGAGTC

Região de promotor *aprE*

451 TCTACGGAAA TAGCGAGAGA TGATATACCT AATAGAGAT AAAATCATCT

Região de promotor *aprE*

501 CAAAAAATG GGTCTACTAA AATATTATTC CATCTATTAC AATAAATTCA

Região de promotor *aprE*

551 CAGAATAGTC TTTTAAGTAA GTCTACTCTG AATTTTITTA AAAGGAGAGG

Região de promotor *aprE*Região de promotor *aprE*

M R S K K L W I S L L F A L T

601 GTAAAGAGTG AGAAGCAAAA AATTGTGGAT CAGCTTGTG TTTGCGTTAA

FIG 14A

15/27

Região de promotor *aprE*

```
-----
BCE103
-----
  . L I F T M A F S N M S A Q A D D
651 CGTTAATCTT TACGATGGCG TTCAGCAACA TGTCTGCGCA GGCTGATGAT

BCE103
-----
  . Y S V V E E H G Q L S I S N G E L
701 TATTCAGTTG TAGAGGAACA TGGGCAACTA AGTATTAGTA ACGGTGAATT

BCE103
-----
NcoI
-----
  . V N E R G E Q V Q L K G M S S H G
751 AGTCAATGAA CGAGGCGAAC AAGTTCAGTT AAAAGGGATG AGTCCCATG

BCE103
-----
NcoI
-----
  . L O W Y G Q F V N Y E S M K W L
801 GTTTCGAATG GTACGGTCAA TTTGTAACT ATGAAAGCAT GAAATGGCTA

BCE103
-----
  . R D D W G I T V F R A A M Y T S S
851 AGAGATGATT GGGGAATAAC TGTATTCCGA GCAGCAATGT ATACCTCTTC

BCE103
-----
  . G G Y I D D P S V K E K V K E T V
901 AGGAGGATAT ATTGACGATC CATCAGTAAA GGAAAAAGTA AAAGAGACTG

BCE103
-----
  . E A A I D L G I Y V I I D W H I
951 TTGAGGCTGC GATAGACCTT GGCAATATG TGTATTGA TTGGCATATC

BCE103
-----
  . L S D N D P N I Y K E E A K D F F
1001 CTTTCAGACA ATGACCCGAA TATATATAAA GAAGAAGCGA AGGATTTCTT

BCE103
-----
  . D E M S E L Y G D Y P N V I Y E I
1051 TGATGAAATG TCAGAGTTGT ATGGAGACTA TCGAATGTG ATATACGAA

BCE103
-----
  . A N E P N G S D V T W D N Q I K
1101 TTGCAATGA ACCGAATGGT AGTGATGTTA CGTGGGACAA TCAATAAAA

BCE103
-----
  . P Y A E E V I P V I R D N D P N N
1151 CCGTATGCAG AAGAAGTGAT TCCGGTTATT CGTGACAATG ACCCTAATTA
-----
```

FIG 14B (Cont)

16/27

BCE103

· I V I V G T G T W S Q D V H H A A ·
1201 CATTGTTATT GTAGGTACAG GTACATGGAG TCAGGATGTC CATCATGCAG

BCE103

· D N Q L A D P N V M Y A F H F Y
1251 CCGATAATCA GCTTGCAGAT CCTAACGTCA TGTATGCATT TCATTTTAT

BCE103

A G T H G Q N L R D Q V D Y A L D ·
1301 GCAGGAACAC ATGGACAAA TTTACGAGAC CAAGTAGATT ATGCATTAGA

BCE103

· Q G A A I F V S E W G T S A A T G ·
1351 TCAAGGAGCA GCGATATTG TTAGTGAATG GGGGACAAGT GCAGCTACAG

BCE103

· D G G V F L D E A Q V W I D F M
1401 GTGATGGTGG TGTGTTTTA GATGAAGCAC AAGTGTGGAT TGACTTTATG

BCE103

D E R N L S W A N W S L T H K D E ·
1451 GATGAAAGAA ATTTAAGCTG GGCCAACTGG TCTCTAACGC ATAAGGATGA

BCE103

PstI

· S S A A L M P G A N P T G G W T E ·
1501 GTCATCTGCA GCGTTAATGC CAGGTGCAAA TCCAACGGT GGTGGACAG

BCE103

· A E L S P S G T F V R E K I R E
1551 AGGCTGAACT ATCTCCATCT GGTACATTG TGAGGGAAAA AATAAGAGAA

BCE103

1° Ligador CBD

S A S I P P S D P T P P S D P G E ·
1601 TCAGCATCTA TTCCGCCAAG CGATCCAACA CCGCCATCTG ATCCAGGAGA

BBI

Sítio de fusão

1° Ligador CBD

BanHI

SacI

· P D P D D E S S K P C C D Q C A C ·
1651 ACCGGATCCA GACGATGAGA GCTCTAAACC CTGTTGCGAT CAATGCGCAT

FIG 14C (Cont)

17/27

BBI

T K S N P P Q C R C S D M R L N
1701 GTACGAATC AAATCCTCCA CAGTGTGGT GTTCCGATAT GCGTCTGAAT

BBI

SphI

S C H S A C K S C I C A L S Y P A
1751 AGCTGTCATA GTGCATGCAA AAGCTGTATC TGCGCCCTGA GTTATCCAGC

BBI

Sall

Q C F C V D I T D F C Y E P C K P
1801 TCAATGTTTT TGGCTCGACA TCACGGACTT CTGCTATGAG CCATGTAAAC

6xHIS

BBI

S E D D K E N H H H H H H Stop (SEQ ID NO: 2)
1851 CAAGCGAGGA CGATAAAGAG AACCATCATC ACCATCACCA TTAAAGTTA

Terminador LAT

HindIII

1901 ACAGAGGACG GATTCCTGA AGGAAATCCG TTTTATTATT TTTAAGCTTG (SEQ ID NO: 2)

FIG 14D (Cont)

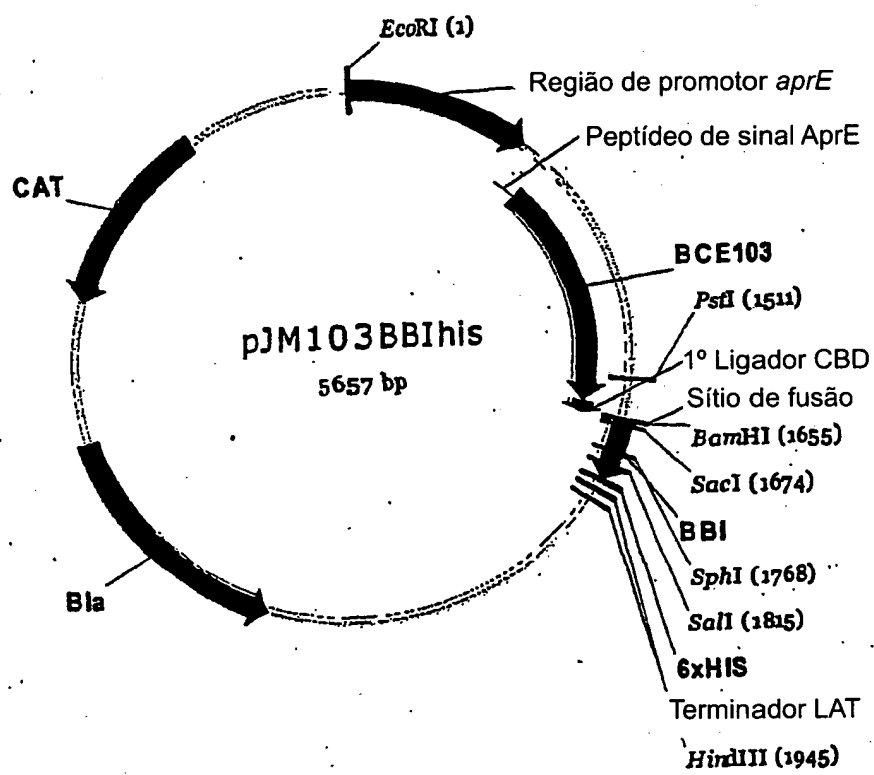


FIG 15

19/27

```
-----
                                12BBick81
-----
BamHI                      SacI
-----
      D P D D E S S   K P C C D Q C A C Y .
1 GGATCCAGAC GATGAGAGCT CTAACCCCTG TTGCGATCAA TCGGCATGTT
  CCTAGGTCCTG CTACTCTCGA GATTGGGAC AACGCTAGTT ACGCGTACAA

                                12BBick81
-----
                                PstI                      EcoRI
                                -----
      . N L Y G W T   C R C S D M R L N S
51 ATAATTTGTA TGGGTGGACT TGTCGCTGCA GCGATATGCG TCTGAATTCC
  TATTAAACAT ACCCACCTGA ACAGCGACGT CGCTATACGC AGACTTAAGG

                                12BBick81
-----
      C H S A C K S   C A C Y N L Y G W T .
101 TGTCTAGTGC CCTGCAAAAG CTGGGCATGT TATAACCTGT ACGGGTGGAC
  ACAGTATCAC GGACGTTTTC GACGCGTACA ATATTGGACA TGCCACCTG

                                12BBick81
-----
                                Sali
                                -----
      . C F C V D I T   D F C Y E P C K P S .
151 CTGTTTTTGC GTCGACATCA CGGACTTCTG CTATGAGCCA TGTAACCAA
  GACAAAAACG CAGCTGTAGT GCCTGAAGAC GATACTCGGT ACATTGGTT

                                12BBick81
-----
      . E D D K E N   * (SEQ ID NO: 36)
201 GCGAGGACGA TAAAGAGAAC TAA (SEQ ID NO: 37)
  CGCTCCTGCT ATTTCTCTG ATT      37
```

FIG 16

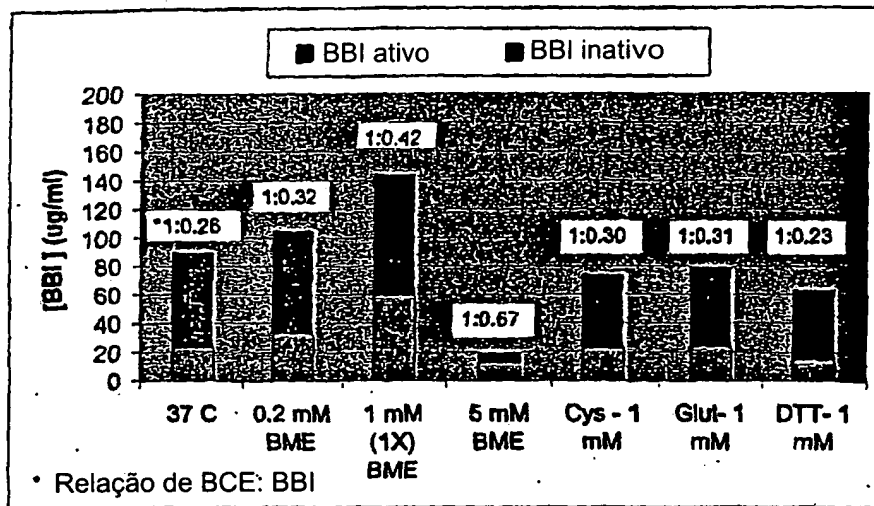


FIG 17

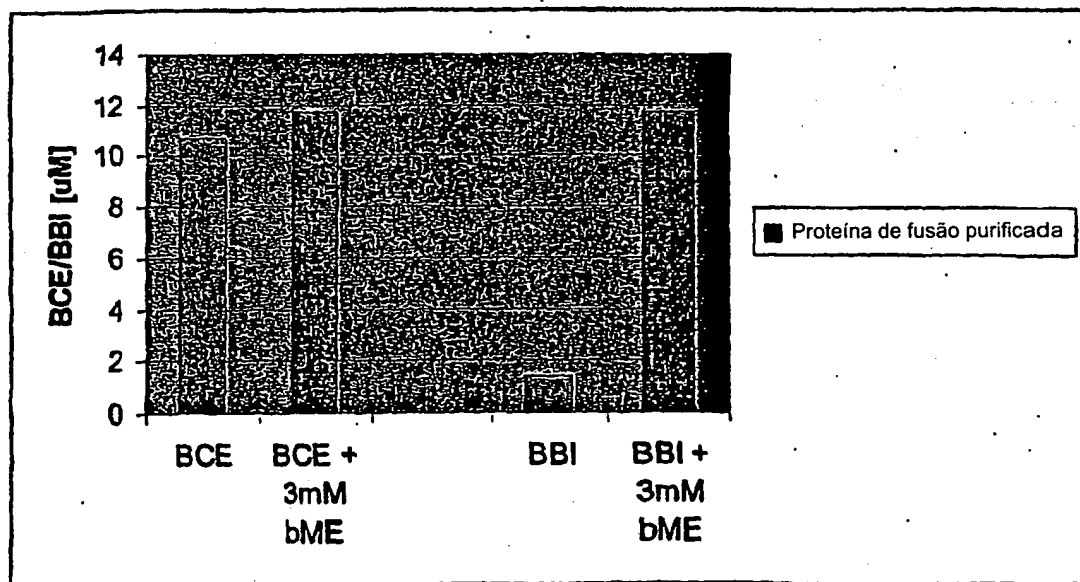


FIG 18

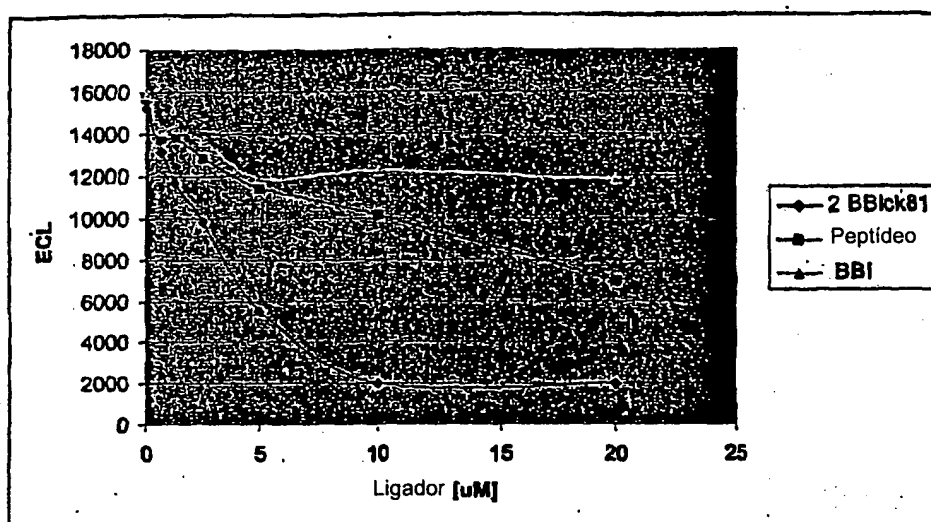


FIG 19

22/27

h1PDI

Sinal de clivagem AprE

BssHII NheI BsrGI

S A Q A S D V V Q L K R D T F D D
1 AGCGCGCAGG CTAGCGATGT TGTACAACTG AAAAAAGACA CTTTCGACGA
TCGCGCGTCC GATCGCTACA ACATGTTGAC TTTTCTGT GAAAGCTGCT
h1PDI

F I R T N D L V L A E F F A P W C
51 CTTTCATCAA ACAATGACC TTGTTCTGCG TGAATTTTC GCGCCGTGGT
GAAGTAGTTT TGTCTACTGG AACAGAAGC ACTTAAAAAG CGCGGCACCA
h1PDI

G H C K A L A P E Y E E A A T T
101 GCGGTCACG CAAAGCTCTT GCTCCTGAGT ACGAGGAAGC TGCAACTACA
CGCCAGTGAC GTTTCGAGAA CGAGGACTCA TGCTCCTTCG ACGTTGATGT
h1PDI

L K E K N I K L A K V D C T E E T
151 CTGAAAGAAA AGAACATCAA ACTTGCTAAA GTAGACTGCA CAGAAGAGAC
GACTTTCTTT TCTGTAGTT TGAACGATT CATCTGACGT GTCTTCTCTG
h1PDI

D L C Q Q H G V E G Y P T L K V F
201 TGATCTTTC CAACAACATG GTGTTGAGGG CTACCCAAT CTTAAAGTTT
ACTAGAAACG GTTGTGTAC CACAACCTCC GATGGGTGA GAATTTCAA
h1PDI

R G L D N V S P Y K G Q R K A A
251 TCCGTGGCCT TGACAACGTA TCTCCTTACA AAGGTCAAGC TAAAGCTGCT
AGGCACCGGA ACTGTTGCAT AGAGGAATGT TTCCAGTTGC ATTTGACGA
h1PDI

A I T S Y M I K Q S L P A V S E V
301 GCAATCACTT CATACATGAT CAAACAATCT CTGCCTGCTG TATCTGAAGT
CGTTAGTGAA GTATGTACTA GTTGTGTAGA GACGGACGAC ATAGACTTCA
h1PDI

T R D N L E E F K K A D K A V L V
351 TACAAAGAC AACCTTGAAG AATTAAAAA AGCTGACAAA GCTGTTCTTG
ATGTTTCTG TTGGAACCTC TTAAATTTT TCGACTGTT CGACAAGAAC
h1PDI

A Y V D A S D K A S S E V F T Q
401 TTGCTTATGT AGATGCTTCT GACAAAGCAT CTAGCGAAGT TTCACTCAA
AACGAATACA TCTACGAAGA CTGTTTCGTA GATCGCTTCA AAAGTGAGT
h1PDI

V A E K L R D N Y P F G S S S D A
451 GTTGCTGAAA AACTGCGCGA TAACTACCCA TTCGGCTCTA GCTCTGATGC
CAACGACTTT TTGACGCGCT ATTGATGGGT AAGCCGAGAT CGAGACTACG

FIG 20A

h1PDI

501 . A L A E A E G V K A P A I V L Y K .
TGCAC TGGCT GAAGCTGAGG GCGTTAAAGC ACCTGCTATT GTTCTTTTACA
ACGTGACCGA CTTGACTCC CGCAATTTTCG TGGACGATAA CAAGAAATGT

h1PDI

551 . D F D E G K A V F S E K F E V E
AAGACTTTGA TGAAGGTAAA GCGGTTTTCT CTGAAAAAT CGAAGTAGAG
TTCTGAACT ACTTCCATTT CGCCAAAAGA GACTTTTTTA GCTTCATCTC

h1PDI

601 . A I E R F A K T G A T P L I G E I .
GCAATCGAAA AATTGCGTAA AACAGGTGCT ACTCCACTTA TTGGCGAAAT
CGTTAGCTTT TTAAGCGATT TTGTCCACGA TGAGGTGAAT AACCGCTTTA

h1PDI

651 . G P E T Y S D Y M S A G I P L A Y .
CGGACCTGAA ACTTACTCTG ATTACATGTC AGCTGGCATC CCTCTGGCAT
GCCTGGACTT TGAATGAGAC TAATGTACAG TCGACCGTAG GGAGACCGTA

h1PDI

SapI

701 . I F A E T A E E R K E L S D K L
ACATTTTCGC TGAACAGCT GAAGAGCGTA AAGAACTCAG CGACAACTT
TGTAAGCGG ACTTTGTCGA CTCTCGCAT TTCTTGAGTC GCTGTTGAA

h1PDI

751 . K P I A E A Q R G V I N F G T I D .
AAACCAATCG CTGAAGCTCA ACGTGGCGTT ATTAACCTTG GTACTATTGA
TTTGGTTAGC GACTTCGAGT TGCACCGCAA TAATTGAAC CATGATACT

h1PDI

801 . A K A F G A H A G N L N L K T D K .
CGCTAAAGCA TTTGGTGCTC ACGCTGGAAA CCTGAATCTG AAAACTGACA
GCGATTTCTG AAACCACGAG TCGGACCTTT GGACTTAGAC TTTTGACTGT

h1PDI

851 . F P A F A I Q E V A K N O K F P
AATTCCCTGC TTTGCAATC CAAGAAGTTG CTAAAAACCA AAAATTCCCT
TTAAGGGACG AAAGCGTTAG GTTCTTCAAC GATTTTGGT TTTAAGGGA

h1PDI

901 . F D Q E K E I T F E A I K A F V D .
TTTGATCAAG AAAAAGAAT TACTTTTGAA GCGATCAAG CATTCGTTGA
AAACTAGTTC TTTTCTTTA ATGAAAACCT CGCTAGTTTC GTAAGCACT

h1PDI

951 . D F V A G K I E P S I K S E P I P .
CGATTTTGT GCTGGTAAAA TCGAACCAAG CATCAAATCA GAACCAATCC
GCTAAACRA CGACCATTTT AGCTTGGTTC GTAGTTTAGT CTTGGTTAGG

h1PDI

1001 . E K Q E G P V T V V V A K N Y N
CTGAAAAACA AGAAGGTCTT GTTACTGTAG TTGTAGCTAA AACTACAAAT
GACTTTTTGT TCTTCCAGGA CAATGACATC AACATCGATT TTTGATGTTA

FIG 20B

hIPDI

1051 E I V L D D T K D V L I E F Y A P
GAAATCGTTC TGGACGATAC TAAAGATGTA TTAATTGAAT TTTACGCTCC
CTTTAGCAAG ACCTGCTATG ATTTCTACAT AATTAACCTA AAATGCGAGG

hIPDI

1101 W C G H C K A L A P K Y E E L G A
TTGGTGCGGT CACTGCAAAG CTCTTGCTCC TAAATACGAA GAACTTGGTG
AACCACGCCA GTGACGTTTC GAGAACGAGG ATTTATGCTT CTTGAACCAC

hIPDI

1151 L Y A K S E F K D R V V I A K V
CTCTGTATGC AAAAAGCGAG TTCAAAGACC GTGTTGTAAT TGCTAAAGTT
GAGACATAC TTTTTCGCTC AAGTTTCTGG CACAACATTA ACGATTTCAA

hIPDI

1201 D A T A N D V P D E I Q G F P T I
GATGCAACAG CTAACGATGT TCCAGATGAA ATTCAAGGAT TCCCTACTAT
CTACGTTGTC GATTGCTACA AGGTCTACTT TAAGTTCCTA AGGGATGATA

hIPDI

1251 K L Y P A G A K G Q P V T Y S G S
CAAATATAC CCAGCTGGTG CAAAAGGTCA ACCTGTTACT TACTCTGGTT
GTTTGATATG GGTGACCCAC GTTTTCCAGT TGGACATGA ATGAGACCAA

hIPDI

1301 R T V E D L I K F I A E N G K Y
CAGGCACTGT TGAAGACCTT ATCAAATTCA TTGCTGAAAA CCGTAAATAC
GTGCGTGACA ACTTCTGGAA TAGTTTAACT AACGACTTTT GCCATTATG

hIPDI

SpeI

1351 K A A I S E D A E E T S S A T E T
AAAGCTGCAA TCTCAGAAGA TGCTGAAGAG ACTAGTTCAG CAACTGAAAC
TTTCGACGTT AGAGTCTTCT ACGACTTCTC TGATCAAGTC GTTGACTTTG

hIPDI

1401 T T E T A T K S E E A A K E T A T
AACTACAGAA ACTGCTACAA AGTCAGAAGA AGCTGCAAAA GAACTGCAA
TTGATGTCTT TGACGATGTT TCAGTCTTCT TCGACGTTTT CTTTGACGTT

Ligador de clivagem de enteropeptidase

hIPDI

1451 E H D E L G S G S G D D D D K D
CAGACACGA CGAACTTGA TCTGGTTCCG GAGATGACGA TGACAAAGAC
GTCTTGCTCT GCTTGAACCT AGACCAAGGC CTCTACTGCT ACTGTTTCTG

BBI N-terminal

SacI

1501 D E S S
GATGAGAGCT CT (SEQ ID NO: 5)
CTACTCTCGA GA (SEQ ID NO: 6)

FIG 20C

Promotor AprE

EcoRI

1 GAATTCTCCA TTTTCTTCTG CTATCAAAAT AACAGACTCG TGATTTTCCA
CTTAAGAGGT AAAAGAAGAC GATAGTTTAA TTGCTGAGC ACTAAAAGGT

Promotor AprE

51 AACGAGCTTT CAAAAAGCC TCTGCCCTT GCAAATCGGA TGCCTGTCTA
TTGCTCGAAA GTTTTTTCGG AGACGGGGAA CGTTAGCCT ACGGACAGAT

Promotor AprE

NotI

101 TAAAATCCC GATATTGGTT AAACAGCGGC GCAATGGCGG CCGCATCTGA
ATTTAAGGG CTATAACCAA TTGTGCGCG CGTTACCGCC GCGTAGACT

Promotor AprE

151 TGTCTTTGCT TGGCGAATGT TCATCTTATT TCTTCCTCCC TCTCAATAAT
ACAGAARCA ACCGCTTACA AGTAGAATAA AGAAGGAGGG AGAGTTATTA

Promotor AprE

201 TTTTTCATTG TATCCCTTTT CTGTAAAGTT TATTTTTCAG AATACTTTTA
AAAAAGTAAG ATAGGGAAAA GACATTTCAA ATAAAAAGTC TTATGAAAT

Promotor AprE

251 TCATCATGCT TTGAAAAAT ATCAGGATAA TATCCATTGT TCTCAGGAA
AGTAGTACGA AACTTTTTTA TAGTGCTATT ATAGGTAACA AGAGTGCCTT

Promotor AprE

301 GCACACGCAG GTCATTTGAA CGAATTTTT CGACAGGAAT TTGCCGGGAC
CGTGTGCGTC CAGTAACTT GCTTAAAAA GCTGTCTTA AACGGCCCTG

Promotor AprE

351 TCAGGAGCAT TTAACCTAAA AAAGCATGAC ATTTCAGCAT AATGAACATT
AGTCCTCGTA AATTGGATTT TTTCGTACTG TAAAGTCGTA TTACTTGTA

Promotor AprE

401 TACTCATGTC TATTTTCGTT CTTTCTGTGA TGAAATAGT TATTTGAGT
ATGAGTACAG ATAAAAGCAA GAAAAGACAT ACTTTTATCA ATAAAGCTCA

Promotor AprE

451 CTGTACGSA ATAGCGAGAG ATGATATACC TAAATAGAGA TAAATCATC
GAGATGCCTT TATCGCTCTC TACTATATGG ATTTATCTCT ATTTTAGTAG

Promotor AprE

501 TCAAAAAAT GGGTCTACTA AAATATTATT CCATCTATTA CAATAAATTC
AGTTTTTTTA CCCAGATGAT TTTATAATAA GGTAGATAAT GTTATTTAAG

Promotor AprE

551 ACAGAATAGT CTTTAAAGTA AGTCTACTCT GAATTTTTTT AAAAGGAGAG
TGTCTTATCA GAAAATTCAT TCAGATGAGA CTTAAAAAAA TTTTCTCTC

Promotor aprE

Peptideo de sinal cutinase

Peptideo de sinal AprE

FIG 21A

V R S K K L W I S L L F A L
601 GGTAAGAGT GAGAAGCAA AAATTGTGGA TCAGCTTGT GTTTGCGTTA
CCATTCTCA CTCTCGTTT TTTAACACCT AGTCGAACAA CAAACGCAT

Cutinase

Cutinase signal peptide

651 T L A A S C L S V C A T V A A A P
ACGCTGGCGG CCTCTTGCC TCCCGTCTGT GCCACTGTG CGGCGGCTCC
TGGACCGCC GGAGAACGGA CAGGCAGACA CGGTGACAG GCCGCGGAG

Cutinase

701 L P D T P G A P F P A V A N F D R
CCTGCCGGAT ACACCGGGAG CGCCATTTC GGCTGTGCG AATTTCGACC
GGACGGCCTA TGTGGCCCTC GCGGTAAAG CCGACAGCG TTAAAGCTG

Cutinase

751 S G P Y T T S S Q S E G P S C R
GCAGTGGGCC CTACACCACC AGCAGCCAGA GCGAGGGGCC GAGCTGTGCG
CGTCACCGGG GATGTGGTGG TCGTCGGTCT CGCTCCCGG CTCGACAGCG

Cutinase

801 I Y R P R D L G Q G G V R H P V I
ATCTATCGGC CCCGCGACCT GGGTCAGGG GCGGTGCGTC ATCCGGTGAT
TAGATAGCG GGGCGCTGGA CCCAGTCCCC CCGCAGCAG TAGGCCACTA

Cutinase

851 L W G N G T G A G P S T Y A G L L
TCTCTGGGG AATGGCACC GTGCCGGGCC GTCCACCTAT GCCGCTTGC
AGAGACCCG TTACCGTGG CACGGCCCG CAGGTGGATA CGGCCGAACG

Cutinase

901 S H W A S H G F V V A A A E T S
TATCGCACTG GGCAGCCAC GGTTTCGTGG TGGCGCGGC GGAACCTCC
ATAGCGTGAC CCGTTCGGTG CCAAAGCACC ACCGCGCCG CCTTTGGAG

Cutinase

951 N A G T G R E M L A C L D Y L V R
AATGCCGGTA CCGGGCGGGA AATGCTCGCC TGCCTGGACT ATCTGGTACG
TTACGGCCAT GGGCCGCCCT TTACGAGCG ACCGACCTGA TAGACCATG

Cutinase

1001 E N D T P Y G T Y S G K L N T G R
TGAGAACGAC ACCCCCTACG GCACCTATTC CGGCAAGTC AATACCGGCG
ACTCTTGCTG TGGGGGATGC CGTGGATAAG GCCGTTCGAG TTATGGCCCG

Cutinase

1051 V G T S G H S Q G G G G S I M A
GAGTCGGCAC TTCTGGGCAT TCCAGGGTG GTGGCGGCTC GATCATGGCC
CTCAGCCGTG AAGACCCGTA AGGTCCAC CACCGCGGAG CTAGTACCGG

Cutinase

1101 G Q D T R V R T T A P I Q P Y T L
GGGCAGGATA CGAGGGTGCG TACCAGGGCG CGATCCAGC CCTACACCT
CCCGTCTAT GCTCCACGC ATGGTGCCGC GGCTAGGTG GATGTGGGA

Cutinase

FIG 21B(Cont)

 1151 . G L G H D S A S Q R R Q Q G P M F .
 CGGCCTGGGG CACGACAGCG CCTCGCAGCG GCGGCAGCAG GGGCCGATGT
 GCGGGACCCC GTGCTGTCCG GGAGCGTCGC GCGCGTCGTC CCCGGCTACA

Cutinase

 1201 . L M S G G G D T I A F P Y L N A
 TCCTGATGTC CGGTGGCGGT GACACCATCG CCTTCCCTA CCTCAACGCT
 AGGACTACAG GCCACCGCCA CTGTGGTAGC GGAAAGGGAT GGAGTTGCGA

Cutinase

 1251 Q P V Y R R A N V P V F W G E R R .
 CAGCCGGTCT ACCGGCGTGC CAATGTGCCG GTGTTCTGGG GCGAACGGCG
 GTCGGCCAGA TGGCCGCACG GTTACACGGC CACAGACCC CGCTTGCCGC

Cutinase

 1301 . Y V S H F E P V G S G G A Y R G P .
 TTACGTGAGC CACTTCGAGC CGGTGCGTAG CGGTGGGGCC TATCGCGGCC
 AATGCAGTCG GTGAAGCTCG GCCAGCCATC GCCACCCCGG ATAGCGCCGG

Cutinase

 1351 . S T A W F R F O L M D D Q D A R
 CGAGCACGGC ATGGTTCCGC TTCCAGCTGA TGGATGACCA AGACGCCCGC
 GCTCGTGCCG TACCAAGGCG AAGGTCGACT ACCTACTGGT TCTGCGGGCG

Cutinase

Alw44I

 1401 A T F Y G A Q C S L C T S L L W S .
 GCTACCTTCT ACGGCGCGCA GTGCAGTCTG TGCACCTCTC TGCTTTGGTC
 CGATGGAAGA TGCCGCGCGT CACGTCAGAC ACGTGAAGAG ACGAARCCAG

Linker 2

Cutinase

BamHI

 1451 . V E R R G L D N N D P I P D
 TGTGGAACGC AGAGGTCTTG ACAACAATGA TCCTATTCGG GATCC
 ACAACTTGGC TCTCCAGAAC TGTGTTACT AGGATAAGGC CTAGG

(SEQ ID NO: 41)
 (SEQ ID NO: 82)

42

FIG 21C

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSIÇÕES DE CUIDADO PESSOAL E MÉTODOS PARA SEU USO**".

A presente invenção refere-se a peptídeos e peptídeos suportados para tratar várias doenças e condições. Em modalidades particularmente preferidas, a presente invenção provê composições e métodos para cuidado pessoal. Em algumas modalidades, a presente invenção provê composições para uso em cuidado da pele e/ou do cabelo, assim como composições cosméticas. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, a presente invenção provê peptídeos e peptídeos suportados para tratar doenças da pele, como rosácea. Em algumas modalidades particularmente preferidas, os peptídeos suportados da presente invenção são peptídeos anti-VEGF. Em modalidades particularmente preferidas alternativas, os peptídeos anti-VEGF são expressados em uma proteína de suporte de esqueleto.

Em algumas modalidades mais preferidas, a proteína de esqueleto compreende BBI.